

血中アルコール分析においてデュアル水素炎イオン化検出器構成で窒素キャリアガスを 使用するためのメソッド変換と評価

Agilent 8697 ヘッドスペースサンプリング/8890 GC
システムによる分析

著者

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Method Translator ツールを使用してキャリアガスをヘリウムから窒素に変更した、血中アルコール分析のためのデュアルカラムヘッドスペース GC/水素炎イオン化検出器 (FID) メソッドを評価しました。この変換の目的は、元のヘリウムキャリアメソッドにおけるすべてのターゲットピークに対応するリテンションタイムを得ることにあります。窒素キャリアガス条件下で、すべてのピークに対し十分なクロマトグラフィー分離能が維持されました。この変更を加えたメソッドは、統計的な観点から、元のヘリウムキャリアメソッドと比較して、同等の性能でキャリブレーションおよび再現性データを生成しました。

はじめに

ヘリウム供給量の変動により、多数の分析ラボの生産性が損なわれる可能性があります。システムの堅牢性を損なうことなくヘリウムキャリアからメソッドを変換できれば、供給の不確実性からラボを保護し、運用コストを削減できるだけでなく、ヘリウムが必須である他のメソッドに融通できるメリットがあります。簡単に代替キャリアガスへ変換できないメソッドもあるものの、血中アルコール分析で従来のヘリウムメソッドから変換するための条件は、窒素キャリアガスのために注入口圧力の設定値を調整するだけです。

この構成で実施されたこれまでの研究では¹、キャリアガスとして高純度ヘリウムを、検出器のメイクアップガス、およびヘッドスペースの加圧ガスとして高純度の窒素を使用しています。キャリアガスを窒素に変換すると、完全にヘリウムを使用しないシステムになります。

Agilent 8890 GC/8697 ヘッドスペースサンプリングシステムに搭載されている 3 つの機能により、このようなキャリアガスの変換を簡単に実行し、確認することが可能です。最初の機能は Method Translator ツールです。このツールは、データシステムのための Agilent GC ドライバ内にある GC Method Editor から使用するか、アジレントのウェブサイトからダウンロードできます。² 2 番目の機能は、データシステム内から、またはブラウザインターフェースからアクセスする、統合型 8697 ヘッドスペースコントロールです。この便利な機能により、同じインターフェースでサンプリングと測定に関するパラメータの両方を一元的に管理できます。3 番目の機能は、ガス識別テストです。GC で適切なガスを設定することは、変換を成功さ

せるために不可欠です。配管ラインからガス供給源にまで辿るのは、たとえ可能だとしても、容易ではありません。8890 GC インテリジェンスは、注入口の電気ロニックニューマティクスコントロールに接続されたガスの特性を確認するアルゴリズムを備えており、ガスが適切に設定されているかを検証します。このようなテストは、GC タッチスクリーンまたはブラウザインターフェースの診断メニューの下にあります。³

実験

スプリット/スプリットレス注入口とデュアル水素炎イオン化検出器 (FID) 付き Agilent 8890 GC を Agilent 8697 ヘッドスペースサンプリングで構成しました。注入されたサンプルをパージなしスプリッタを使用して、血中アルコール分析で一般的に使用される 2 つの補完的カラムにスプリットしました (図 1)。表 1 と表 2 にヘリウムおよび窒素を用いたメソッドの機器パラメータを示します。表 3 に評価に使用した消耗品と標準液を示します。

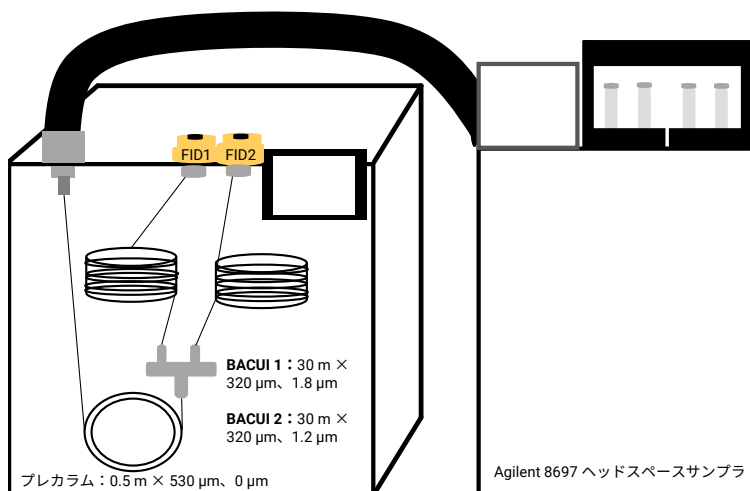


図 1. 血中アルコール成分分析のためのシステム構成

表 1. ヘリウムおよび窒素キャリアメソッドのための GC メソッドパラメータ

Agilent 8890 GC の条件				
注入口	スプリット/スプリットレス (ヘリウム)	スプリット/スプリットレス (窒素)	検出器	水素炎イオン化検出器 (フロント/バック)
温度	150 °C	150 °C	温度	250 °C
スプリット比	10:1	10:1	エアフロー	400 mL/min
モード	定圧, 21 psi	定圧, 18 psi	水素流量	30 mL/min
			メイクアップ (窒素)	25 mL/min
オープン	40 °C で 5 分間保持	40 °C で 5 分間保持		

表 2. ヘリウムおよび窒素キャリアメソッドのためのヘッドスペースメソッドパラメータ

8697 ヘッドスペースサンプラの条件 (両方)	
オープン温度	70 °C
ループ温度	80 °C
トランスファーライン温度	90 °C
バイアル平衡化時間	7 分
注入時間	1 分
バイアルのサイズ	20 mL
バイアル充填モード	デフォルト
充填圧力	15 psi
加圧ガス	窒素
ループ充填モード	カスタム
最終ループ圧力	1.5 psi
ループの平衡化	0.05
ループ容量	1 mL

ヘリウムキャリアガスのパラメータと Method Translator ツール (スタンドアロンとしてダウンロードするか、Agilent GC データシステムで、図 2 に示された GC カリキュレータからアクセス) を使用し、ヘリウムメソッドから窒素キャリアガスに適したパラメータを迅速に得ることができます。

今回のメソッド変換のために、1 の分析時間を適用して、カラムのホールドアップ時間を保持しました。この手法は、リテンションタイムと分析時間を元のメソッドに近く保とうとする場合に最適な選択肢です。

表 3. この評価で使用した消耗品と標準物質。

消耗品	部品番号	標準	部品番号	ベンダー
20 mL バイアルおよびクリンブキャップ	5190-2286	BAC 分析混合物	5190-9765	Agilent
注入口ライナ、ウルトライナート、内径 2 mm	5190-6168	エタノール検量線	G3440-85036	Agilent
トランスファーライン (フューズドシリカ)	160-2535-5	t-ブタノール、>99 %	24127	Millipore/Sigma
プレカラム : 0.5 m × 0.53 mm, 0 μm	160-2535-10	カスタム溶媒混合溶液	カスタム	Restek
カラム 1 : BAC1 UI (30 m × 0.32 mm, 1.8 μm)	123-9334UI	分注 MilliQ 水	—	Millipore/Sigma
カラム 2 : BAC2 UI (30 m × 0.32 mm, 1.2 μm)	123-9434UI			

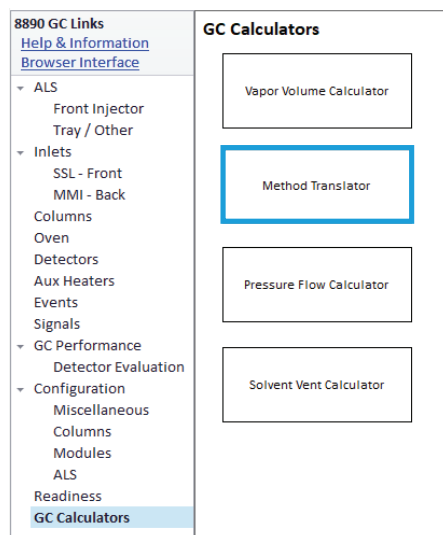


図 2. Agilent データシステム内の Agilent Method Translator ツールの位置の画面

図3に示すように、他のすべてのパラメータを維持したままキャリアガスを変更した場合、注入口圧力は21 psi（ヘリウム）から19 psi（窒素）に低下します。このメソッドはシングルカラム分析ではなく、2本のカラムへのプレカラムスプリットを含む機器構成であるため、最適な注入口圧力は計算値よりも若干低い18 psiと決定しました。その結果、ピーク幅の大きな広がりも、検量線範囲内でのごくわずかなリテンションタイムの調整もなく、分離能が若干向上しました。図3の例では、DB-BAC1 UI カラム寸法と同じカラム条件を採用しています。DB-BAC2 UI カラムの寸法を入力すると、流量と平均線速度は若干低くなるものの、注入口圧力は同じ計算値になり、ホールドアップタイムはわずかに長い0.705分となります。

結果と考察

ヘリウムキャリアの性能との比較は、エタノールの直線性、バイアル間の再現性、化合物の分離能で行いました。

エタノールの直線性

20 ~ 400 mg/dL で6点の検量線を作成することでエタノールの直線性を評価しました。キャリアレーションサンプルは、内部標準として100 mg/dL の t-ブタノールを含む450 µLの水に50 µLのエタノール標準液を添加して調製しました。検量線を図4に示します。窒素キャリアガスを使った場合にも直線性および感度の低下は見られません。図5にヘリウムキャリアメソッドにおける両FIDの検量線を示します。表4では両構成における検量線を詳細に比較しています。

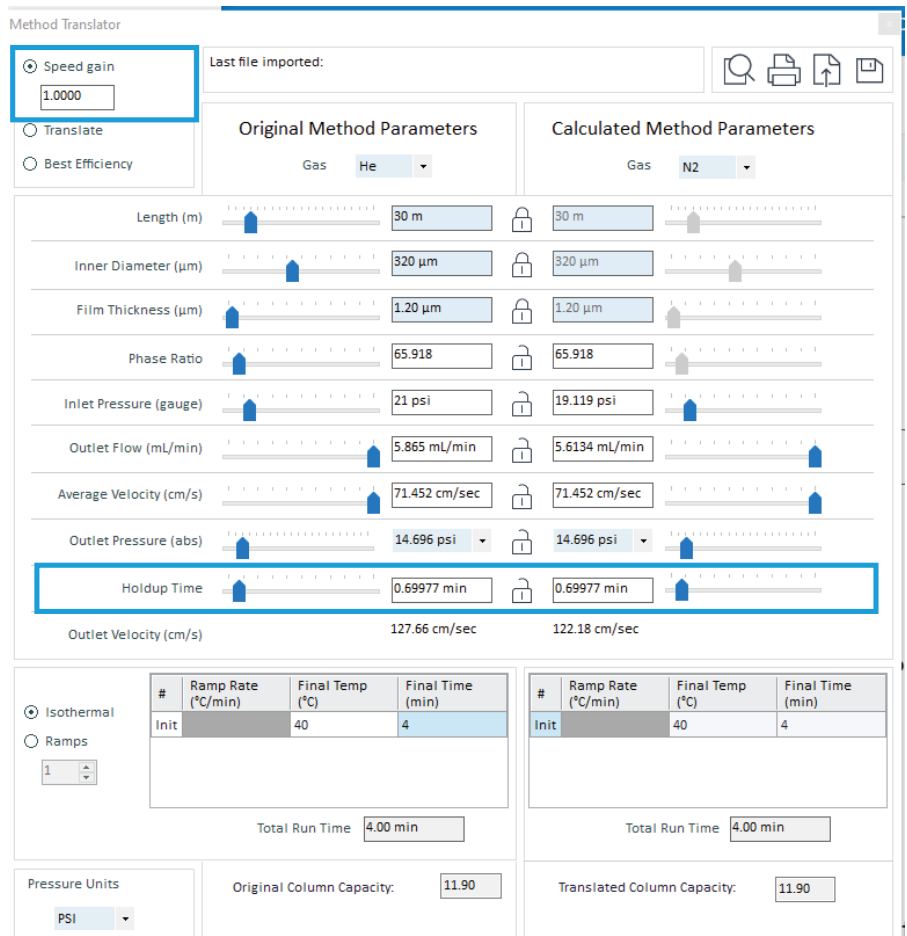


図3. GC データシステム内で表示される、Agilent Method Translator ツールの画面。パラメータフィールドのDB-BAC1 UI カラムの条件を使用して、ヘリウムと窒素キャリアガス間の変換が表示されています。

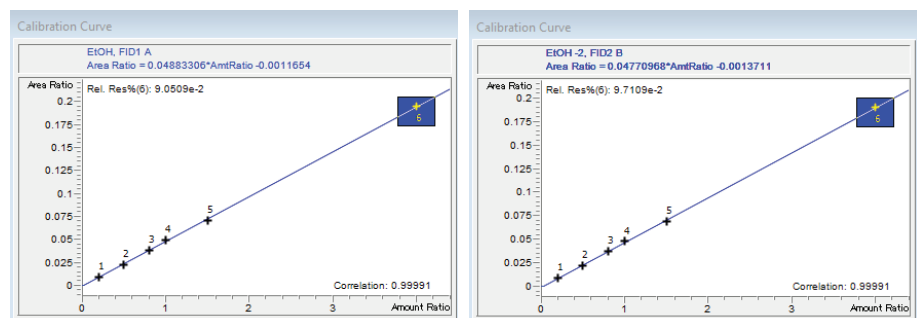


図4. ヘリウムキャリアガスを使用した、Agilent J&W DB-BAC1 UI と DB-BAC2 UI カラムのエタノールの検量線

再現性

再現性の統計データ (表 5) は、Restek が調製したカスタムブレンドである、品質管理 (QC) 混合溶液の 10 回連続注入で計算しました。バイアルは、内部標準として 100 mg/dL の t-ブタノールを含む 450 μ L の水と、50 μ L の QC 混合溶液で調製し、各バイアルに 50 mg/dL の濃度の溶液を作成しました。

表 5 に示すように、窒素キャリアガスを使用した構成は、大半の成分でヘリウム構成と同等か、より優れたデータを示しました。ヘッドスペースアプリケーションにおける再現性性能は、リークのない、適切にメンテナンスされたシステムに加え、サンプル前処理とキャッピング手法に大きく依存します。

分離能

クロマトグラフィー分離能の理論上の低下は、多数の GC メソッドで窒素がヘリウムキャリアガスの実用的な代替物と見られない一般的な理由の 1 つとなっています。図 6 にヘリウムおよび窒素の分析結果を示します。このような状況において、変換された条件の下で分析全体にわたりリテンションタイムにはおおむね影響がないことがわかります。分析対象物のリテンションタイムは分離能の計算に不可欠であるため、両方のキャリアガス条件下でのリテンションタイムを比較した詳細なデータを示しています。

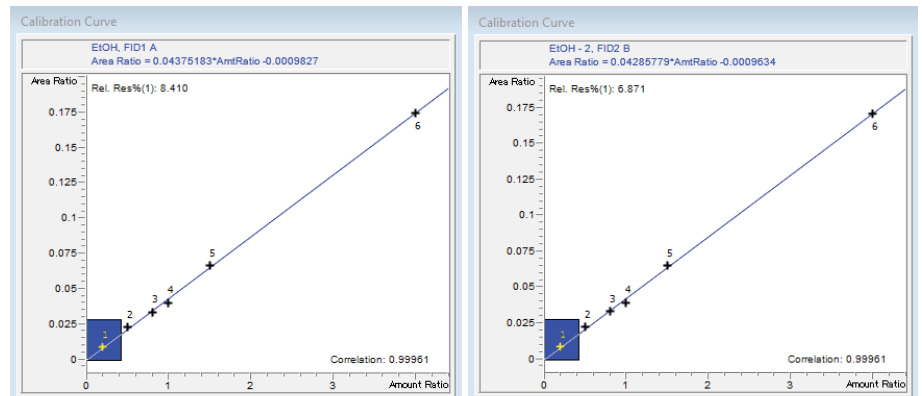


図 5. 窒素キャリアガスを使用した、Agilent J&W DB-BAC1 UI と DB-BAC2 UI カラムのエタノールの検量線

表 4. ヘリウムと窒素キャリアガスにおけるエタノール検量線定数の比較

	ヘリウムキャリアガス		窒素キャリアガス	
	DB-BAC1 UI	DB-BAC2 UI	DB-BAC1 UI	DB-BAC2 UI
傾き	0.0488	0.0477	0.0438	0.0429
切片	-0.0011	-0.0014	-0.0010	-0.0010
相関	0.9999	0.9999	0.9995	0.9995

表 5. 50 mg/dL QC 混合溶液の 12 回連続注入に関するリテンションタイム (RT) および相対レスポンス係数 (RRF) 統計データ

化合物	ヘリウムキャリア				窒素キャリア			
	DB-BAC1 UI		DB-BAC2 UI		DB-BAC1 UI		DB-BAC2 UI	
	RT	RRF	RT	RRF	RT	RRF	RT	RRF
メタノール	0.03 %	2.06 %	0.03 %	1.72 %	0.03 %	2.64 %	0.04 %	2.19 %
アセトアルデヒド	0.04 %	2.09 %	0.00 %	2.11 %	0.01 %	0.76 %	0.01 %	0.83 %
エタノール	0.00 %	2.16 %	0.02 %	1.69 %	0.03 %	2.27 %	0.02 %	2.16 %
イソプロパノール	0.02 %	1.49 %	0.03 %	1.34 %	0.03 %	1.79 %	0.01 %	1.83 %
アセトン	0.02 %	0.74 %	0.00 %	1.01 %	0.02 %	1.09 %	0.01 %	0.72 %
2-ブタノン	0.04 %	1.90 %	0.02 %	1.61 %	0.03 %	0.83 %	0.03 %	0.99 %

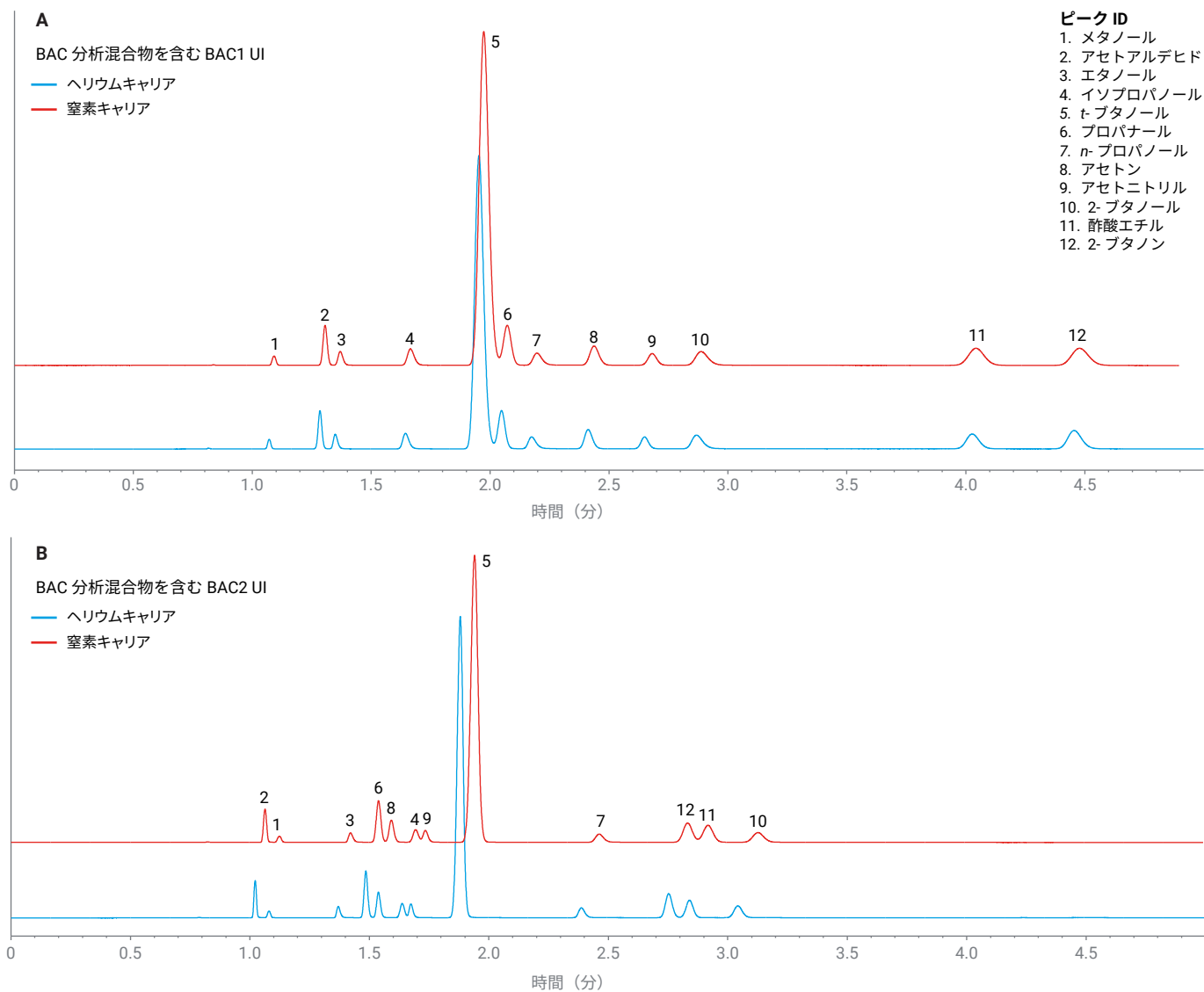
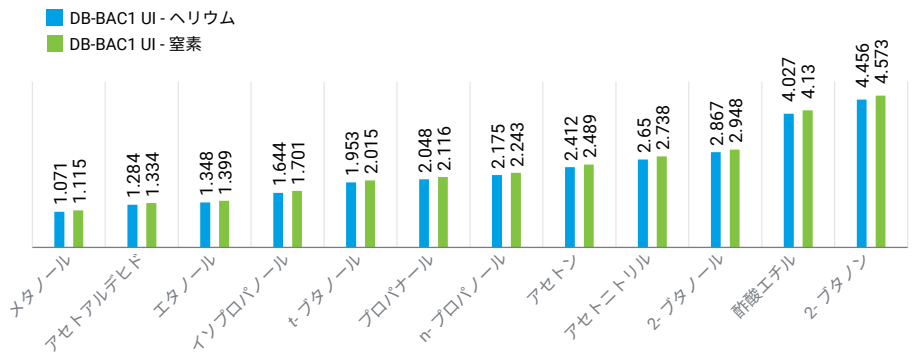


図 6. 窒素キャリアガスを使用した、Agilent 血中アルコールチェックアウト混合溶液の 50 mg/dL 注入のクロマトグラム

図 7 は、両方のキャリアガスで両カラムにおける分離能計算に使用したリテンションタイムの値です。

分離能は最新のデータシステムに掲載の USP の式を使用して計算しました。図 8 は、DB-BAC1 UI および DB-BAC2 UI カラムにおけるヘリウムと窒素の結果を比較したものです。窒素キャリアメソッドでは重要な成分の分離度が若干低いものの、多くのラボの QC 要件のニーズに十分に答えられます。

A Agilent J&W DB-BAC1 UI での RT の比較



B Agilent J&W DB-BAC2 UI での RT の比較

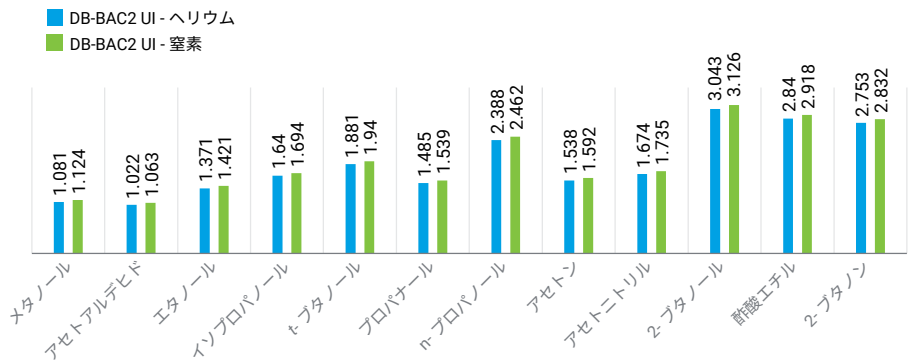
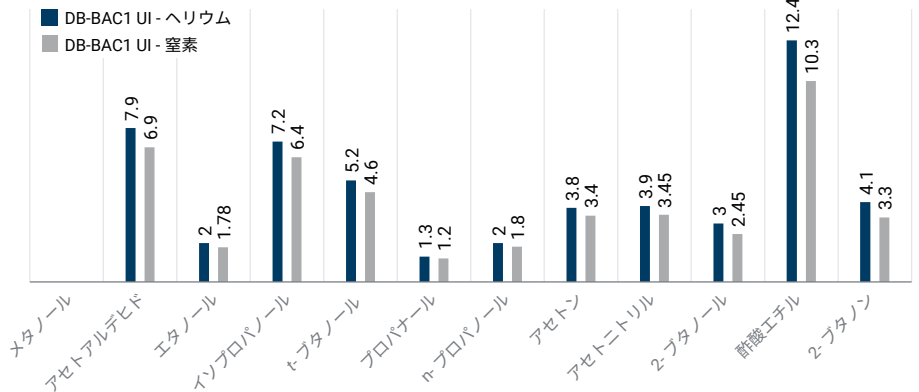


図 7. Agilent J&W DB-BAC1 UI (A) と DB-BAC2 UI (B) カラムのヘリウムと窒素キャリアガスにおけるリテンションタイム (RT) の比較

特長：ガス識別テスト

8890、8860、Intuvo 9000 GCに組み込まれているガス識別テストは、注入口モジュールに接続されたガスが、システムによって設定されたガスと一致していることを確認するための非接触式の診断テストです。この診断テストは、複数のキャリアガスオプションの下で GC 構成を評価している場合に有用です。設定されたガスの特性を使用して、例えば、流量を提供するために必要な圧力を計算します。設定されたガスが実際のガスと一致しない場合は、エラーや正しくない結果が生じる可能性があります。この診断は 1 分未満で完了し、ユーザーがガスクロマトグラフでキャリアガス設定を変更する場合のエラーを解消します。最高の結果を得るために、10 psig 以上の注入口圧力が推奨されます。図 9 に、不合格のキャリアガス結果と修正するためのオプション、および合格した診断テスト結果を示します。

A Agilent J&W DB-BAC1 UI での分離能の比較



B Agilent J&W DB-BAC2 UI での RT の比較

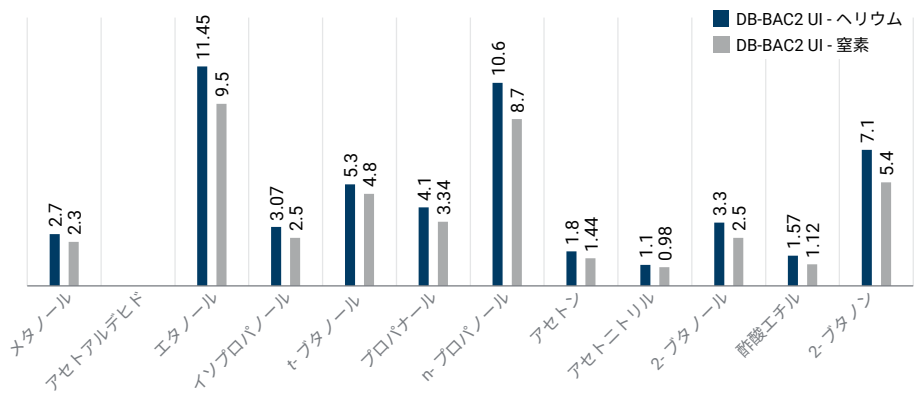


図 8. Agilent J&W DB-BAC1 UI (A) と DB-BAC2 UI (B) カラムのヘリウムと窒素キャリアガスにおける USP 分離能 (R) の比較。メタノール (DB-BAC1 UI) とアセトアルデヒド (DB-BAC2 UI) は分析で最初のピークであるため、これらの分離能の値はありません。

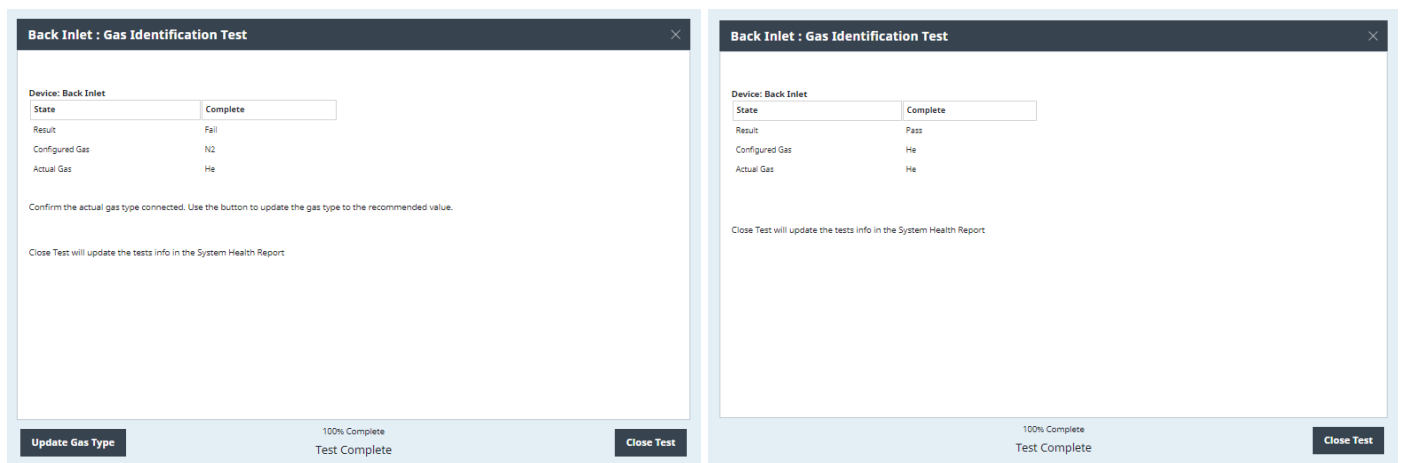


図 9. ガス識別テストの画像。最初のボックスに、設定されたガスが実際のガスの種類と一致しない場合に、不合格の結果が返されます。ソースでガスの種類を確認することで、設定を修正して診断を開始できます。この場合、ガス設定を修正し、設定されたガスが実際のガスと一致すると合格の結果が返されます。

結論

ヘリウムは多くのラボにとって重要なリソースですが、入手に関して懸念すべき状況が繰り返して生じています。これらの分析結果は、より持続可能で経済的なキャリアガスである窒素が、データインテグリティを犠牲にすることなく、ヘッドスペースのエタノールの分析に使用できることを示しています。直線性、再現性、クロマトグラフィー分離能などのメソッド性能を元のヘリウムメソッドと比較したところ、ほぼ同等の性能を得ることができ、これによりヘリウム不足の期間を回避することが可能です。Agilent Method Translator ツールなどの従来の機能と、新しい GC インテリジェンスの機能を組み合わせることで、重要なリソースの入手可能性に起因する懸念や中断を低減しつつ、より効率的な業務に焦点を効果的にシフトさせ、メソッド変換の負担を軽減できます。

参考文献

1. Fausett, Agilent 8697 ヘッドスペースサンブラと8890 GC デュアル FID システムによる血中アルコール分析、アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、資料番号 5994-3126JAJP, **2021**.
2. GC Calculators and Method Translation Software. <https://www.agilent.com/en/support/gas-chromatography/gccalculators> (accessed **2022**-11-07).
3. Agilent 8890 Browser Interface Diagnostics. Agilent Technologies. YouTube, Apr 14, **2022**. https://www.youtube.com/watch?v=vRe8j78Bp8s&list=PLThrdl2ragom_g5055hddaMc-hcwr2_1d&index=114 (accessed **2022**-11-07).

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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おりません。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。

RA45124.4069907407

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, July 18, 2023

5994-6508JAJP