

Agilent 7696A ワークベンチを用いた 複雑なマルチステップサンプル前処理 の自動化

アプリケーションノート

バイオ燃料・代替エネルギー

著者

James D. McCurry, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、マルチステップのサンプル前処理を自動化しました。ワークベンチの性能を実証するテスト例として、ASTM メソッド D6584 を選択しました。このメソッドでは、ガスクロマトグラフィー分析の前に、不揮発性汚染物質の複雑な誘導体化が求められます。このワークベンチを用いて、複数の種類のバイオディーゼルと、ターゲット化合物の定量に用いるキャリブレーション標準を前処理しました。ワークベンチを用いたサンプル前処理の結果は、手作業での前処理で得られた結果とほぼ同じでした。また、その分析精度はきわめて高く、業界で定められた仕様内に十分に収まりました。ワークベンチをさらにテストするために、複数の化学者グループに、バイオディーゼルサンプル用の自動サンプル前処理メソッドを実行してもらいました。このテストでも、各グループで得られた分析結果はほぼ同じで、分析精度はきわめて高くなりました。



Agilent Technologies

はじめに

化学分析のサンプル前処理には、溶媒を添加するだけの簡単なケースもあれば、その後の機器測定を向上させるために化学反応を生じさせるような複雑なケースもあります。サンプル前処理はあらゆる化学測定に不可欠な要素ですが、この作業を心待ちにしている化学者はほとんどいません。複雑で退屈なうえに、有害な化学薬品を扱わなければならないケースなら、なおさらです。そのため、手作業によるサンプル前処理は、多くのミスや精度低下の原因となることがあります。ミスを減らして精度を高めるために、手作業によるサンプル前処理では、多くの場合、大容量の化学物質や高価な計測用ガラス容器を用いて、ハンドリングや分注、計量を簡便にしています。

手作業による前処理が難しいメソッドの例として、ASTM メソッド D6584 が挙げられます。このメソッドでは、B100 バイオディーゼルに含まれる遊離グリセリンと総グリセリンを測定し、製品品質が良好であることを確かめます [1]。バイオディーゼルに含まれる各種のグリセリンは不揮発性なので、ガスクロマトグラフィー (GC) では測定できません。メソッド D6584 には、そうした化合物をトリメチルシリル化試薬により誘導体化し、GC で分析できるようにするためのサンプル前処理プロトコルが記載されています。このサンプル前処理手順は複雑で、時間がかかるうえに、きわめて不快なおいを持つ毒性溶媒のピリジンを使用します。そのため、このサンプル前処理手法は、バイオディーゼルの扱う化学者の間では嫌がられています。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、自動サンプル前処理のために設計されたスタンドアロン型の機器です [2,3]。このワークベンチでは、2 台の 7693A 注入タワーに取り付けられたシ

リンジを用いて、液体を計量して 2 mL バイアルへ分注します。各種の化学リソース、標準、サンプルの入ったバイアルは、3 つの 50 ポジショントレイに設置されます。サンプルトレイコンパートメントには、バイアルを動かすロボットアーム、ボルテックス混合ステーション、サンプル加熱ステーションが備わっています。

7696A ワークベンチ手順の設計

ASTM D6584 の前処理手順は、表 1 に示す 6 つのステップですべて説明できます。手作業で行う場合、この前処理では、大量の標準、試薬、溶媒、使い捨てガラス容器を消費します。Agilent ワークベンチでは、小さい 2 mL バイアルを使用するため、この前処理手順を 10 分の 1 にスケールダウンすることが可能です。また、このワークベンチでは、2 つのシリンジを用いて液体を分注するため、使い捨てガラス容器に伴う費用も排除されます。表 1 には、ワークベンチを用いた場合に、各ステップが 2 mL バイアルに合わせてどのようにスケールダウンされるかも示しています。

ワークベンチを用いたサンプル前処理手順の構築に先立ち、まず必要な化学リソースと、ワークベンチトレイにおける各リソースのポジションを決定しました。表 2 には、各リソースとそれぞれのトレイポジション、各リソースの分注に用いたピペッティングシリンジのパラメータを示しています。ワークベンチソフトウェアでは、図 1 に示すように、サンプルトレイのリソースを上から見た図も表示されます。この例では、トレイポジション 1~10 にある 10 のサンプルと、各サンプルとともに使用する 10 の n-ヘプタンリソースを示しています。n-ヘプタンバイアルは、トレイポジション 101~110 に配置されています。

表 1. ASTM メソッド D6584 では、6 ステップの誘導体化によりバイオディーゼル中のグリセリンを誘導体化し、高温 GC 分析に対応できるようにサンプルを前処理します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでは 2 mL バイアルを使用するため、手作業でのサンプル前処理を 10:1 にスケールダウンする必要があります。

ステップ	15 mL バイアルを用いた手作業でのサンプル前処理	10:1 スケールダウン → 2 mL バイアルを用いたワークベンチのサンプル前処理
1	B100 100 mg をテフロン製スクリーキャップを備えた 15 mL バイアルに添加	B100 10 mg をテフロン製スクリーキャップを備えた 2 mL バイアルに添加
2	ISTD1 溶液 (ブタントリオール) 100 µL をバイアルに添加	ISTD1 溶液 (ブタントリオール) 10 µL をバイアルに添加
3	ISTD2 溶液 (トリカブリン) 100 µL をバイアルに添加	ISTD2 溶液 (トリカブリン) 10 µL をバイアルに添加
4	誘導体化試薬 (MSTFA) 100 µL をバイアルに添加し混合	誘導体化試薬 (MSTFA) 10 µL をバイアルに添加し混合
5	室温で 15 分間反応	室温で 15 分間反応
6	n-ヘプタン 8 mL をバイアルに添加し混合	n-ヘプタン 800 µL をバイアルに添加し混合

表 2. バイオディーゼル中のグリセリンの誘導体化を完了させるためには、4つの化学リソースが必要です。各リソースとトレイポジション、シリンジパラメータはワークベンチソフトウェアで設定します。記載のシリンジ吸引スピードを用いて、各リソースをシリンジにロードします。記載のシリンジ分注スピードを用いて、各リソースを2 mL サンプルバイアルに分注します。

化学リソース	トレイ ポジション	シリンジ サイズ (μL)	シリンジ吸引 スピード (μL/min)	シリンジ排出 スピード (μL/min)
ISTD1 (ビリジ中 1000 μg/mL ブタントリオール)	51	100	250	500
ISTD2 (ビリジ中 8000 μg/mL トリカプリン)	52	100	250	500
MSTFA 誘導体化試薬	53	100	250	500
n-ヘプタン	101-110	250	500	2000

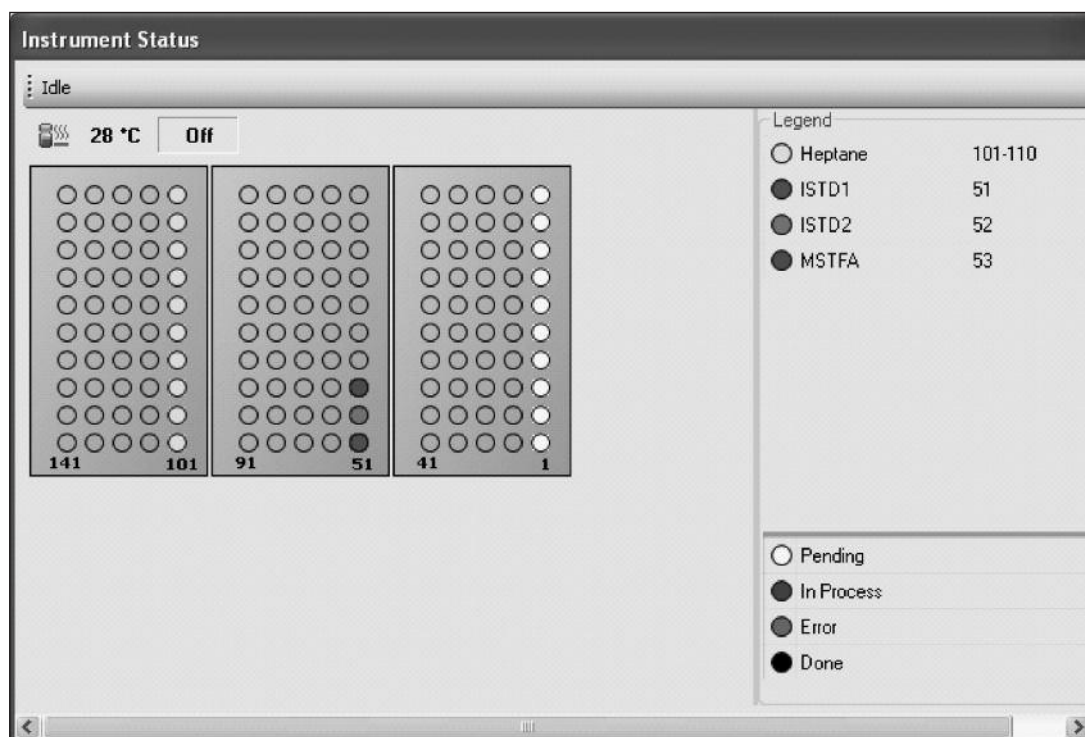


図 1. ワークベンチソフトウェアでは、サンプルトレイの各化学リソースを上から見た図が表示されます。この例では、化学リソースのほかに、トレイポジション 1~10 に 10 のサンプルが配置されています。

ワークベンチには化学天秤がないため、サンプルの計量はできません。バイオディーゼル 10 mg を計量するのはきわめて難しいため、エッペンドルフリファレンス容量調節ピペット (10~100 μL) を用いてサンプルを分注しました。バイオディーゼル 10 mg の計量にあたっては、手作業でピペットを用いて、バイオディーゼル 11.4 μL を風袋引きした 2 mL バイアルに移し、0.1 mg にもっとも近くなる重量を記録しました。

手作業によるサンプル前処理ワークフローを再現するために、表 2 に示した各ステップについてワークベンチメソッドを作成しました。たとえば、ADD_ISTD1.M と呼ばれるメソッドにより、

第 1 の内標準溶液 (ISTD1) をすべてのサンプルに添加してから、ADD_ISTD2.M メソッドを用いて第 2 の内標準溶液 (ISTD2) を添加しました。このアプローチなら、シリンジを溶媒で洗浄するのは、別のリソースに切り替えたあとだけで済みます。これにより、必要な洗浄溶媒の量が大幅に減少し、洗浄溶媒を補充せずに多くのサンプルを前処理することが可能になります。シリンジ洗浄ステップを含むワークベンチサンプル前処理手順を表 3 に示しています。図 2 に示すように、ワークベンチのシーケンスキューにより各メソッドを実行すれば、サンプル前処理が完了します。

表 3. サンプル前処理プロトコルの各ステップと各ステップの実行に必要なワークベンチメソッド

ステップ	バイオディーゼル前処理プロトコル	メソッド名	備考
1	ISTD1 溶液 10 µL をすべてのサンプルバイアルに添加	ADD_ISTD1.M	リアータワーの 100-µL シリンジを使用
2	100 µL シリンジ洗浄	Wash_Back.M	リアータワーの溶媒リザーバ
3	ISTD2 溶液 10 µL をすべてのサンプルバイアルに添加	ADD_ISTD2.M	リアータワーの 100-µL シリンジを使用
4	100 µL シリンジ洗浄	Wash_Back.M	リアータワーの溶媒リザーバ
5	MSTFA 10 µL をすべてのサンプルバイアルに添加し混合	ADD_MSTFA.M	リアータワーの 100-µL シリンジを使用
6	100 µL シリンジ洗浄	Wash_Back.M	リアータワーの溶媒リザーバ
7	室温で 15 分間反応	Reaction.M	すべてのサンプルで 15 分の待機時間 1 回を使用
8	n-ヘプタン 800 µL をすべてのサンプルバイアルに添加し混合	ADD_Heptane.M	フロントタワーの 250-µL シリンジを使用

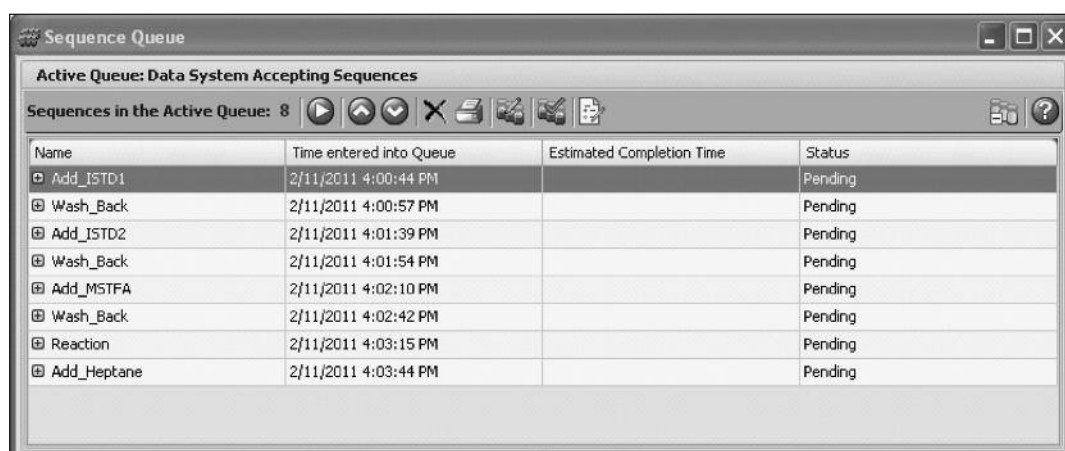


図 2. 表 3 に示すワークベンチメソッドの実行に使用するワークベンチシーケンスキュー

実験方法

ASTM D6584 の実行に対応するように Agilent 7890A GC を構成しました。構成の概要を表 4 に示しています。バイオディーゼルサンプルおよび標準の分析に用いた GC 条件を表 5 に示しています。

GC キャリブレーション用標準の作成

ASTM D6584 では、サンプルに用いるのと同じ前処理手順で、5 つのキャリブレーション用標準を誘導体化することも求められています。標準の GC 分析で得られた検量線の直線性を評価してから、サンプルを分析しました。キャリブレーション用標準の前処理は、サンプルと同じプロトコルを用いて、手作業とワークベンチの両方で行いました。手作業で前処理したバイオディーゼルサンプルの定量には、手作業の前処理で得られた検量線を使用しました。ワークベンチで前処理したサンプルの定量には、ワークベンチで前処理した標準により得られた検量線を使用しました。

手作業によるサンプル前処理とワークベンチによるサンプル前処理の比較

多くのユーザーが考える最初の疑問は、「スケールダウンしたワークベンチサンプル前処理で、手作業のサンプル前処理と同じ結果が得られるのか？」という点でしょう。その疑問に答えるために、手作業の ASTM プロトコルとワークベンチを用いて、2 種類のバイオディーゼルサンプルを前処理しました。第 1 のバイオディーゼルサンプルは、小規模な地元製造業者のもので、原材料にキャノーラ油を使用しました。第 2 のサンプルは全国規模の製造業者のもので、原材料に大豆油を使用しました。手作業とワークベンチのいずれのプロトコルについても、各バイオディーゼルサンプルを 2 回繰り返して前処理および分析し、ASTM メソッドに従って繰り返し精度 (単一ユーザー精度) を評価しました。

マルチユーザー精度 - 再現性

マルチユーザー精度を評価するために、4人の化学者に大豆バイオディーゼルサンプル、キャリブレーション用標準、表2に示す化学リソースおよびワークベンチを提供しました。各化学者に表3に記載したサンプル前処理手順のリストを提供し、ワークベンチプロトコルを開発および使用するように依頼しました。それぞれが開発したワークベンチ前処理プロトコルを用いて、大豆バイオディーゼルサンプルを2回繰り返して前処理したのち、GC分析を実施しました。

表 4. ASTM メソッドによるサンプル分析に用いたガスクロマトグラフィー機器構成

標準 Agilent 7890A GC ハードウェア

G3440A	Agilent 7890A シリーズ GC
オプション 122	EPC コントロール搭載クールオンカラム注入口
オプション 211	EPC コントロール搭載キャピラリー FID
G4513A	Agilent 7693A ALS

カラム

分析カラム	Select Biodiesel for Glycerides (バイオディーゼルのグリセリド分析用カラム) 15 m x 0.32mm id x 0.1 μm フィルム (p/n cp9078)
-------	--

データシステム	Agilent Multi-Technique Chemstation
---------	-------------------------------------

消耗品

5181-1267	10 μL テフロン製固定オートインジェクタシリンジ
-----------	----------------------------

標準および試薬

5190-1408	バイオディーゼル D6584 キャリブレーション用標準キット
5190-1407	バイオディーゼル MSTFA キット 試薬グレードの n-ヘプタン

表 5. ASTM メソッド D6584 の GC 機器条件

クールオンカラム注入口

初期温度	50 °C
温度プログラム	オーブントラックモード
カラム流量	ヘリウム、3 mL/min 定流量モード
カラム温度	
初期	50 °C で 1 分間
スピード 1	15 °C/min で 180 °C まで、0 分間保持
スピード 2	7 °C/min で 230 °C まで、0 分間保持
スピード 3	30 °C/min で 380 °C まで、10 分間保持
水素炎イオン化検出器	380 °C

結果

GC キャリブレーション用標準の作成

グリセリン、モノオレイン、ジオレイン、トリオレインの5レベル検量線を図3に示しています。この検量線の作成に用いた5つの標準の前処理には、Agilent ワークベンチを使用しました。グリセリンの検量線を用いて、バイオディーゼルサンプルに含まれる遊離グリセリンを定量しました。サンプル中のモノグリセリドの定量にはモノオレインの検量線を用い、ジグリセリドにはジオレインの検量線を用い、トリグリセリドにはトリオレインの検量線を使用しました。同じキャリブレーション用標準を手作業でも前処理し、それを用いて検量線を作成しました。表6では、手作業のサンプル前処理とワークベンチのサンプル前処理をおこなった4つの化合物すべてについて、検量線と比較しています。手作業のサンプル前処理とワークベンチのサンプル前処理では、ほぼ同じ検量線が得られました。また、ワークベンチによるサンプル前処理の相関係数 (r^2) は、0.99 以上という ASTM の仕様を上回りました。

表 6. 手作業およびワークベンチによるサンプル前処理で得られた検量線は、各化合物の傾きと切片の値が示しているように、一致性がきわめて高くなりました。いずれの前処理メソッドも、0.99 以上という ASTM の相関係数値 (r^2) 要件を満たしています。

化合物	手作業による前処理			サンプル前処理ワークベンチ		
	傾き	y 切片	r^2	傾き	y 切片	r^2
グリセリン	1.0433	0.0028	0.9997	1.1027	0.0049	0.9995
モノオレイン	1.3446	-0.0171	0.9997	1.3786	0.0044	1.0000
ジオレイン	1.2176	-0.0010	0.9999	1.2086	-0.0014	0.9999
トリオレイン	0.8303	-0.0018	0.9965	0.8703	0.0030	1.0000

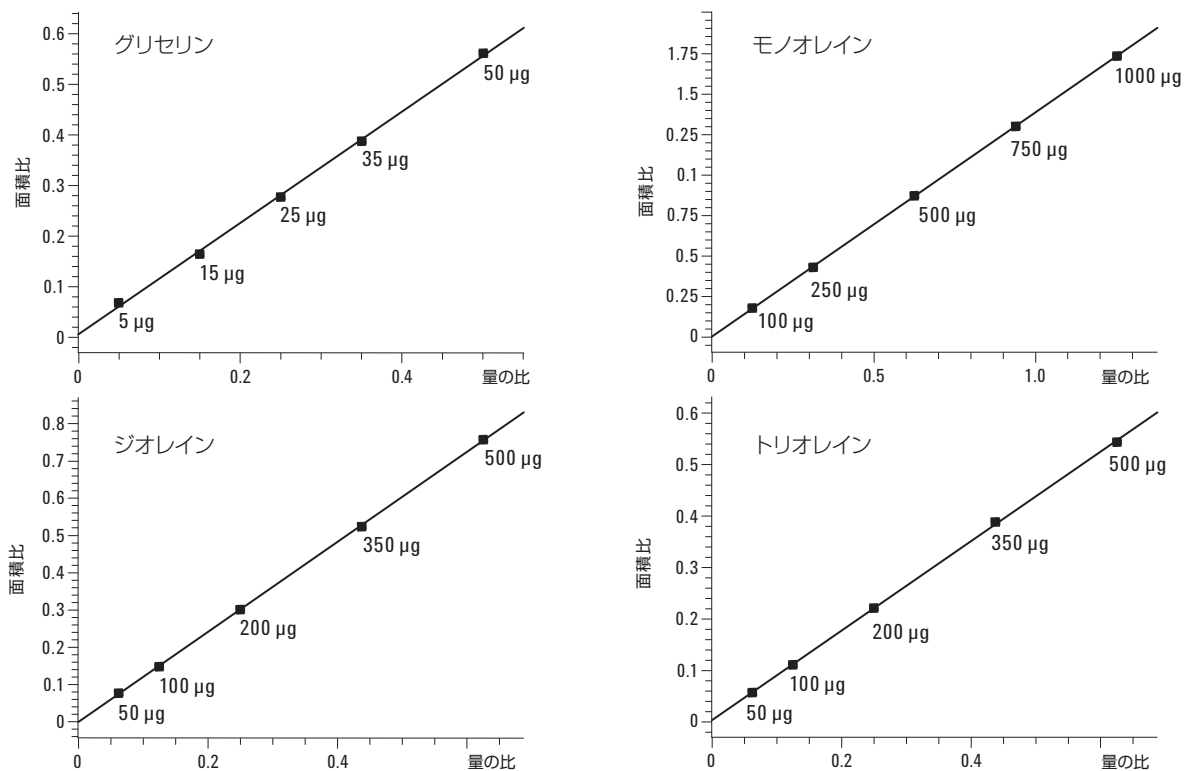


図 3. ワークベンチを用いて前処理した標準の検量線

手作業によるサンプル前処理とワークベンチによるサンプル前処理の比較

手作業およびワークベンチにより前処理したバイオディーゼルサンプルを、ASTM メソッド D6584 に従って分析しました。図 4 では、手作業およびワークベンチによるサンプル前処理で得られたバイオディーゼルサンプル 1 (キャノーラ) のクロマトグラムを比較しています。各種グリセリンが溶出する領域では、どちらのクロマトグラムも同じに見えます。すべてのサンプルについて、遊離グリセリンおよび総グリセリンを定量しました。結果を表 7 に示しています。ワークベンチによるサンプル前処理では、手作業で前処理した場合と同じ結果が得られました。どちらのサン

プルについても、2 回繰り返して前処理および分析を行い、サンプル前処理の繰り返し精度を測定しました。繰り返し精度 (r) を用いれば、各サンプルの繰り返し分析の誤差を調べ、単一オペレーターにおける精度を測定することができます。表 7 に示すように、ワークベンチを用いたサンプル前処理の繰り返し精度は、ASTM がこの分析について定める最低繰り返し精度を上回っています。この結果は、10 分の 1 にスケールダウンしても、ワークベンチを用いたサンプル前処理では、大容量の化学薬品や試薬、溶媒を用いる手作業のサンプル前処理と同じ精度を容易に得られることを示しています。

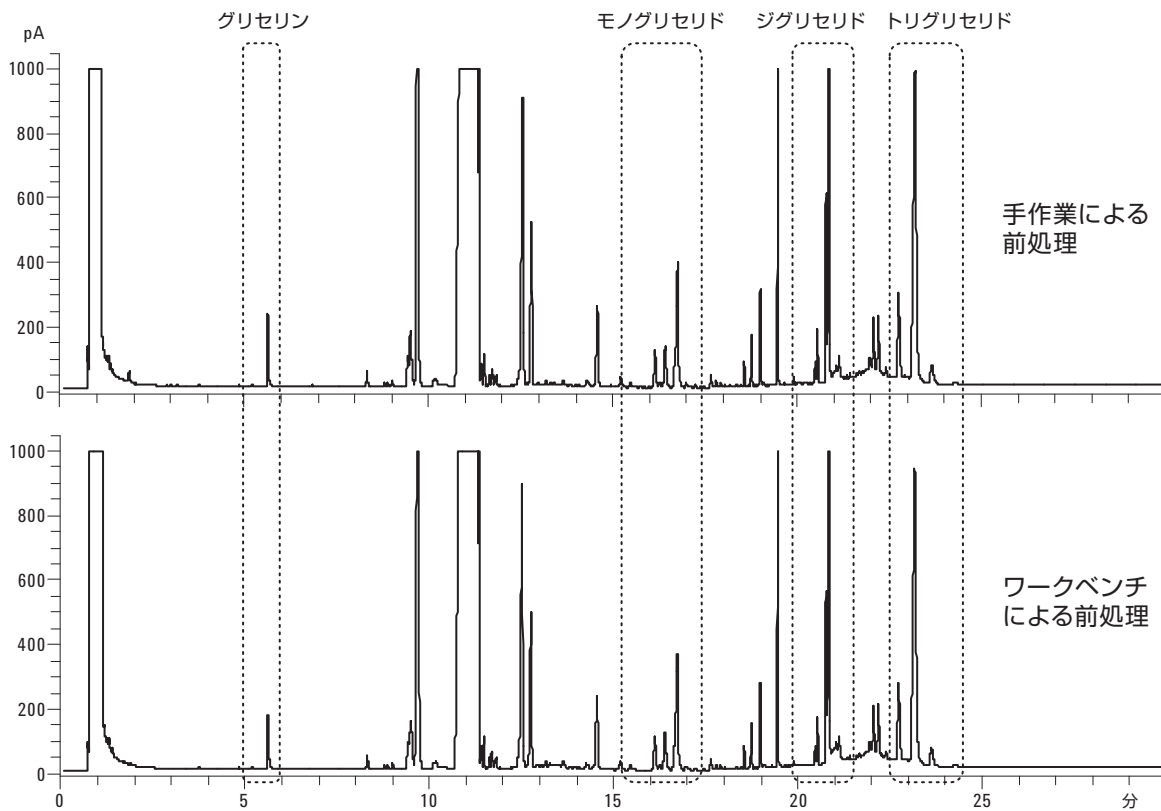


図 4. 手作業および Agilent ワークベンチを用いて前処理したキャノーラバイオディーゼルサンプルのデータ比較。これらのクロマトグラムからは、グリセリン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドが分離される 4 つの領域における一致性が著しく高いことが見てとれます。

表 7.2 種類のバイオディーゼルのいずれについても、ワークベンチにより前処理したサンプルの結果は、手作業で前処理したサンプルの結果とほぼ同じでした。ワークベンチで前処理したサンプルの精度 (繰り返し精度) は、ASTM 仕様内に十分に収まっています。

バイオディーゼルサンプル 1 (キャノーラ)							
	手作業による前処理			サンプル前処理ワークベンチ			繰り返し精度 (r) 仕様
	分析 1	分析 2	r	分析 1	分析 2	r	
遊離グリセリン	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.58E-04
モノグリセリド	0.169	0.169		0.168	0.163		
ジグリセリド	0.282	0.286		0.291	0.286		
トリグリセリド	0.533	0.536		0.565	0.554		
総グリセリン	0.984	0.991	0.007	1.023	1.003	0.020	0.083

バイオディーゼルサンプル 2 (大豆)							
	手作業による前処理			サンプル前処理ワークベンチ			繰り返し精度 (r) 仕様
	分析 1	分析 2	r	分析 1	分析 2	r	
遊離グリセリン	0.008	0.008	0.000	0.008	0.008	0.000	0.002
モノグリセリド	0.138	0.144		0.141	0.140		
ジグリセリド	0.022	0.023		0.022	0.021		
トリグリセリド	0.009	0.009		0.006	0.005		
総グリセリン	0.177	0.184	0.007	0.176	0.174	0.002	0.046

異なる分析者間での分析精度 - 再現性

図 5 では、4 日にわたって 4 人の化学者が個別に前処理した同一の大豆バイオディーゼルサンプルの分析結果を示しています。各化学者のクロマトグラフィー分析結果は、ほぼ同じになりました。各化学者により得られた定量分析結果と、グループ間精度

(再現性) 評価を表 8 に示しています。これらの結果は、複数の化学者がそれぞれ自動ワークベンチプロトコルを用いて同一サンプルを前処理した場合にも、きわめて高い精度が得られることを示しています。

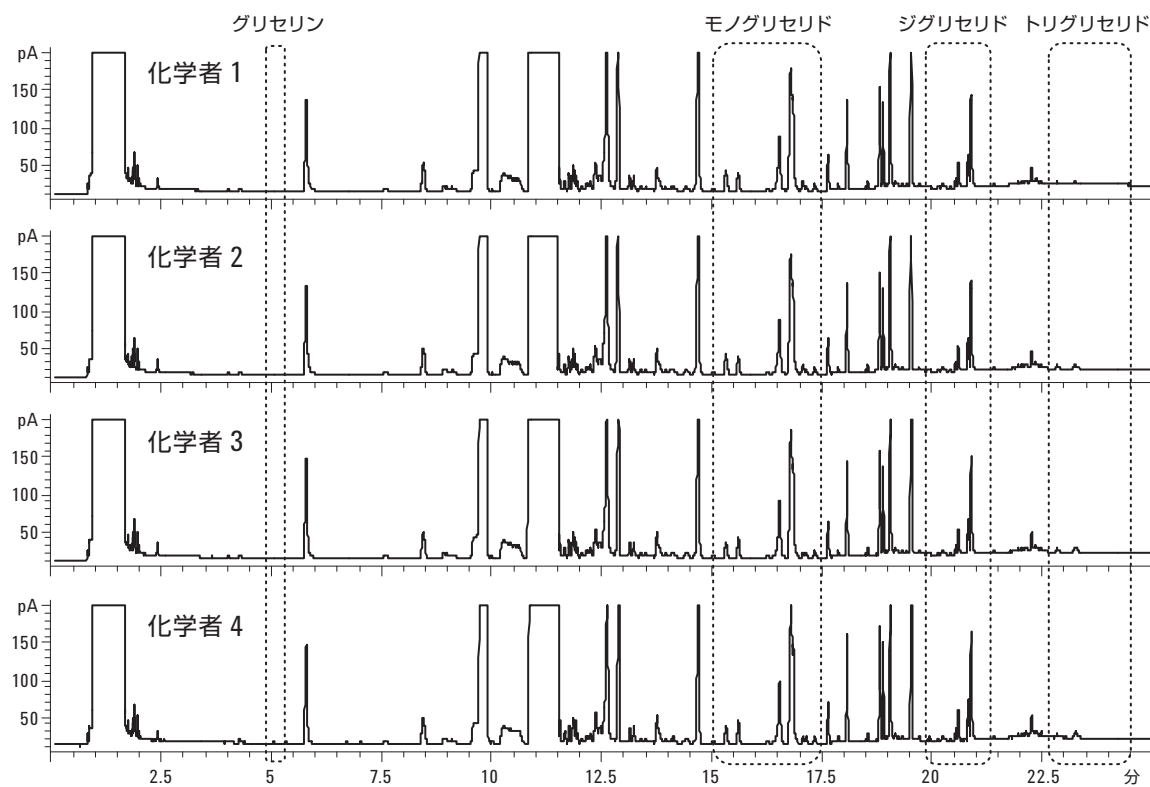


図 5. 4 日にわたって 4 人の化学者が前処理した大豆バイオディーゼルサンプルのデータ比較。各化学者がそれぞれワークベンチサンプル前処理プロトコルを開発し、ASTM メソッド D6584 を用いてサンプルを分析しました。ほぼ同じ結果が得られています。

表 8. Agilent ワークベンチを用いた自動サンプル前処理では、各化学者がほぼ同じ結果を得られました。精度 (再現性) は、複数オペレーターに関して定められた ASTM 仕様を十分に満たしています。

	化学者 1			化学者 2			再現性 (r)	ASTM R 仕様
	分析 1	分析 2	平均	分析 1	分析 2	平均		
遊離グリセリン	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.007
モノグリセリド	0.107	0.114	0.111	0.109	0.118	0.113		
ジグリセリド	0.032	0.034	0.033	0.033	0.036	0.034		
トリグリセリド	0.009	0.009	0.009	0.008	0.009	0.008		
総グリセリン	0.152	0.161	0.156	0.154	0.166	0.160	0.005	0.094

	化学者 3			化学者 4			再現性 (r)	ASTM R 仕様
	分析 1	分析 2	平均	分析 1	分析 2	平均		
遊離グリセリン	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.007
モノグリセリド	0.116	0.114	0.115	0.113	0.114	0.113		
ジグリセリド	0.033	0.033	0.033	0.032	0.033	0.032		
トリグリセリド	0.007	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006		
総グリセリン	0.160	0.157	0.159	0.155	0.157	0.156	0.004	0.091

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A ワークベンチを使えば、複雑なマルチステップのサンプル前処理プロトコルを自動化できることを実証しています。ワークベンチを用いたサンプル前処理により得られた分析結果は、従来の手作業によるサンプル前処理で得られた分析結果に一致しました。2 mL バイアルに合わせて前処理手順をスケールダウンしても、ワークベンチを用いたサンプル前処理では、きわめて高い定量精度が得られました。また、ワークベンチによるサンプル前処理のスケールダウンにより、溶媒、試薬、キャリブレーション用標準の使用量が 10 分の 1 になりました。使い捨てガラス容器や高価な計量用ガラス容器を使う必要もありません。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

参考文献

1. “D6584 Test Method for Determination of Free and Total Glycerine in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography”, ASTM International:100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
2. 「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ」カタログ、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6908JAJP、January 28, 2011
3. 「自動化されたサンプル前処理によるデータ品質の向上」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6874JAJP、December 10, 2010

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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. 2011

Printed in Japan

March 1, 2011

5990-7525JAJP



Agilent Technologies