

UV-Vis 測定用の独自のマルチチャンネル型 シッパーフローセルポンプの利点

手作業でのキュベットによる測定と比較すると、シッパによる測定では時間が短縮され、測定精度が向上



著者

Dr. Wesam Alwan

Agilent Technologies Inc.

はじめに

ラボのルーチン測定を行う分析システムのスループットを向上させることは、時間とコストの削減につながります。とはいえ、スループットの向上と引き換えに分析精度を犠牲にするようなことがあってはなりません。UV/Vis 分光光度計を用いた測定の効率を考える場合、手作業で行われるサンプルの充填、キュベットの取り扱いおよび洗浄といったサンプルのハンドリングに大きく左右されます。

今回の検討では、分光光度計内に設置したフローセルに液体サンプルを送液するように設計されたペリスタティックポンプの使用による測定と、手作業による測定を比較しました。アクセサリである Cary シッパは、分光光度計のソフトウェアから制御できるため、分析メソッドに組み込むことができます。

Cary シッパは、3 チャンネルに対応した独自の設計で、同時に 3 つの液体サンプルをフローセルに送液できます。これによって Cary 3500 UV-Vis システムの同時測定機能の利点を活かし、サンプルオートメーションの効果を確実に得ることができます。

今回の比較検討には、分析アプリケーションとして一般的な、市販の発泡錠剤ビタミン C (L-アスコルビン酸) の定量を行いました。

実験方法

スタンダードの調製

L-アスコルビン酸の原液は、0.1 M 塩酸 (HCl) 100 mL に純 L-アスコルビン酸 50.0 ミリグラムを 23.5 °C で溶解して調製し、pH 1.5 の原液 500 mg/L を得ました。さらに、この原液を 0.1 M HCl で希釈し、表 1 に示すように、濃度 0 ~ 70 mg/L の 8 つのスタンダードを準備しました。これらのスタンダードが対象とする吸光度範囲は約 0 ~ 4 であり、これは UV/Vis 分光光度計による通常のルーチンスキャンの代表的な範囲です。Cary シッパ使用の有無に関わらず、すべての測定で同じスタンダード溶液を用いました。

表 1. 調製したスタンダードの濃度および測定吸光度の平均値 (n=3)

スタンダード ID	濃度 (mg/L)	吸光度
スタンダード 1	0	0.0014
スタンダード 2	10	0.5893
スタンダード 3	20	1.1584
スタンダード 4	30	1.7088
スタンダード 5	40	2.2768
スタンダード 6	50	2.8228
スタンダード 7	60	3.4147
スタンダード 8	70	3.9120

サンプルの調製

市販の発泡錠剤ビタミン C (L-アスコルビン酸) は薬局で購入しました。ラベルには、1 錠に 1000 ミリグラムのビタミン C が含まれると記載されていました。20 錠の錠剤の重量をそれぞれ記録し (表 2)、各錠剤を乳鉢と乳棒ですり潰しました。この粉末から、5.5 ~ 28.0 mg までの異なる量のサンプルを得ました。得た粉末を 100 mL の Milli-Q ろ過水に溶解し、23.5 °C で pH 1.5 に調製しました。

これにより 0 ~ 70 mg/L に収まる 20 個のサンプルを得ました。Cary シッパ使用の有無に関わらず、すべての測定に同じサンプル溶液を用いました。

製品ラベルに示されるとおり、1 錠に含まれるビタミン C 量を 1000 mg と想定して、各サンプル溶液のビタミン C 量を算出しました。この計算は、各錠剤の重量および各サンプル溶液作成に用いた、すり潰した錠剤粉末の重量に基づいています。各サンプル溶液の最終濃度も算出しました。いずれについても、算出値は表 2 に示すとおりです。

表 2. 20 錠のビタミン C 錠剤の重量および各サンプル溶液に含まれる粉末化した錠剤の重量

サンプル番号	錠剤重量 (mg)	粉末分取量 (mg)	溶液中のビタミン C 算出含有量 (mg)	溶液のビタミン C 算出濃度 (mg/L)
1.	4209	16.6	3.9	39.4
2.	4253	19.0	4.5	44.7
3.	4239	28.0	6.6	66.1
4.	4212	11.9	2.8	28.3
5.	4247	5.5	1.3	13.0
6.	4239	18.0	4.2	42.5
7.	4238	22.1	5.2	52.1
8.	4231	16.5	3.9	39.0
9.	4242	28.0	6.6	66.0
10.	4201	7.5	1.8	17.9
11.	4219	18.4	4.4	43.6
12.	4229	18.0	4.3	42.6
13.	4214	6.5	1.5	15.4
14.	4219	24.0	5.7	56.9
15.	4261	20.8	4.9	48.8
16.	4209	13.8	3.3	32.8
17.	4234	15.0	3.5	35.4
18.	4241	13.0	3.1	30.7
19.	4268	17.6	4.1	41.2
20.	4229	8.0	1.9	18.9

機器

今回の検討には、Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計を用いました。Cary 3500 機器を組み込むことで、最大 8 ポジション (サンプル 7 個とリファレンス 1 個) のキュベットを同時に測定できるようになります。測定の半数に対しては、この機器のサンプルコンパートメント内に設置された 3 つのフローセルに 3 つのサンプル溶液を同時に送液できる Cary シッパを機器に接続しました (図 1 参照)。残りの半数は、手作業でキュベットに移し、さらに分光光度計に移しました。



図 1. Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計に接続された Cary シッパーアクセサリ

シッパー測定は、分析する溶液を入れた 15 mL のファルコンチューブにシッパー注入チューブを挿入して行いました。続いて、この溶液を、光路長 10 mm の石英製 390 μ L フローセル 1 個に送液しました。クロスコンタミネーション回避のため、スキャンごとにフローセルを Milli-Q 水で洗浄しました。各スタンダードおよび各サンプルの測定を 3 回繰り返しました。

Cary シッパーポンプは、80 rpm の固定速度で動作します。測定前に、溶液をフローセルに送液する時間を「充填」時間と呼びます。次に、送液を停止して溶液を安定させる時間を「保持」時間と呼びます。シッパーで最後に設定するのが、セルに洗浄液を送液する時間です。これを「洗浄」時間と呼びます。この 3 つの時間の設定はすべて Cary UV ワークステーションソフトウェアで実行でき、メソッドの一部として保存できます。

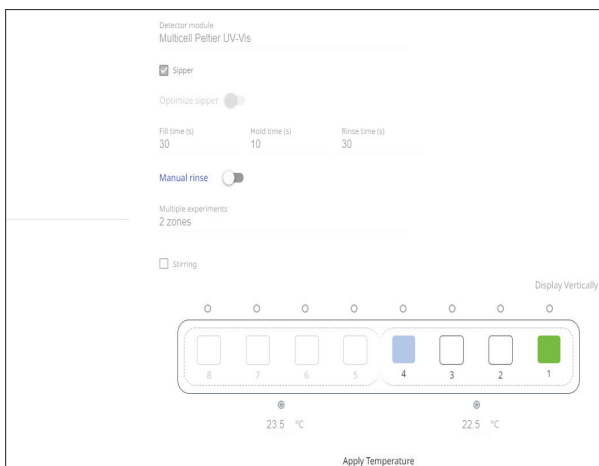


図 2. Cary UV ワークステーションソフトウェアで Cary シッパーアクセサリを制御

残り半分の測定には、光路長 10 mm の石英製 3.5 mL キュベットを使用しました。これらのキュベットに手作業で溶液を充填し、測定ごとにキュベットを Milli-Q 水で洗浄しました。各スタンダードおよび各サンプルの測定を 3 回繰り返しました。

結果を直接比較できるように、いずれの機器設定でも、同じスタンダード溶液とサンプル溶液を使用しました。

測定は、Cary UV ワークステーションソフトウェアに含まれる定量アプリケーションを用いて行いました。このアプリケーションでは、検量線を生成し、その検量線に基づいたサンプル濃度が決定されるメソッドを実行できます。

表 3 記載のパラメータに基づいて、各スタンダードおよび各サンプルの波長スキャンを 350 ~ 200 nm で実施しました。サンプルは、0.1 M HCl によってベースライン補正しました。定量は、243 nm のピーク波長で行いました。また、各スタンダードで得られた吸光度の値に基づいて、検量線を生成しました。サンプルは同じ機器パラメータに基づいて測定し、各サンプルのビタミン C 含有量を定量しました。

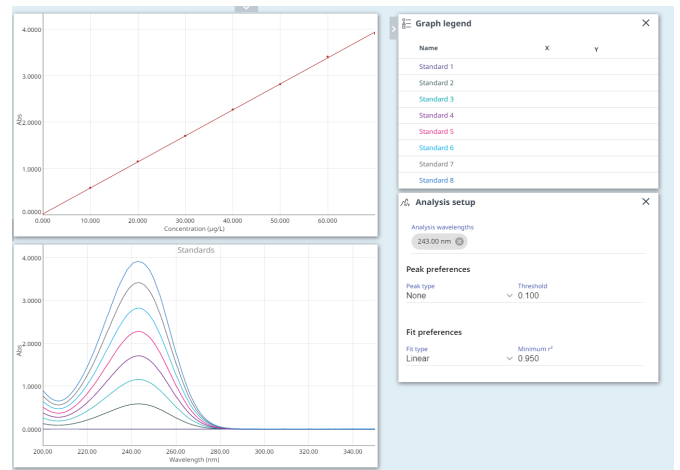


図 3. スタンダード溶液それぞれの波長スキャン。検量線の生成も、それに続くサンプルの定量も、243 nm での吸光度に基づいています。

キュベットを手作業で充填するより Cary シッパーを用いる方が速い可能性があるため、一連の測定を行ってどれだけ時間を節約できたか数値化しました。溶液 30 個（スタンダード 10 個とサンプル 20 個）を、次の 4 つの方法で測定しました。

1. 3.5 mL キュベット 1 個を使用し、シッパーは使用せず。測定ごとのキュベットの充填、排出および洗浄は手作業で行いました。

- 3.5 mL キュベット 3 個を使用し、シッパ―は使用せず。測定ごとのキュベットの充填、排出および洗浄は手作業で行いました。Cary 3500 マルチセル機器の同時測定機能を使って、3 個のキュベットすべてを同時に測定しました。
- シッパ―を使用して、フローセル 1 個に送液。
- シッパ―を使用して、フローセル 3 個に送液。

表 4 に示す機器パラメータに基づいて測定を行いました。

表 3. 定量測定に用いた機器パラメータ

パラメータ	設定
波長範囲 (nm)	200~350
スペクトルバンド幅	1
平均時間 (s)	0.1
データ間隔 (nm)	1
フローセル容量 (μL)	390
充填時間 (秒)	30
保持時間 (秒)	10
洗浄時間 (秒)	30

表 4. 速度比較測定に用いた機器パラメータ

パラメータ	設定
波長範囲 (nm)	200~350
スペクトルバンド幅	1
平均時間 (秒)	0.1
データ間隔 (nm)	1
フローセル容量 (μL)	390
充填時間 (秒)	15
保持時間 (秒)	5
洗浄時間 (秒)	15

結果と考察

検量線の直線性

Cary シッパ―を使用し、8 つのスタンダードに基づいて生成された検量線の R^2 は 0.9997、キュベット測定に基づいて生成された検量線の R^2 は 0.9998 でした。Cary 3500 は 3 Abs を超える優れた測光直線性を有しています。これは、極めて濃度の高い液体サンプルの測定で正確な測光結果が得られることを意味します。

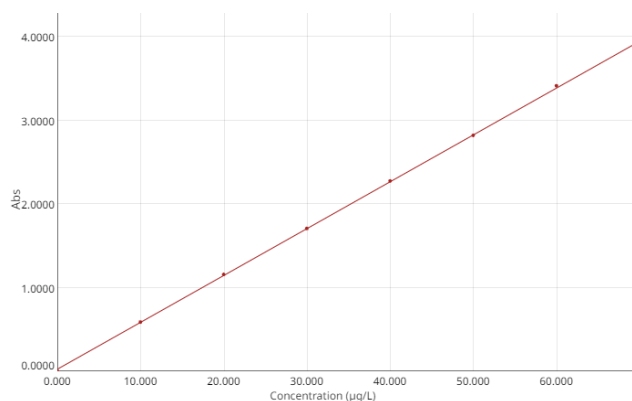


図 4. 手作業で充填した石英製キュベットを用いて生成した検量線

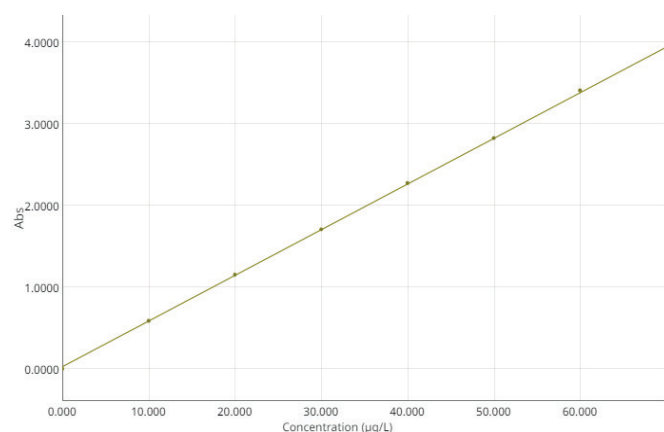


図 5. Cary シッパ―を用いて生成した検量線

測定精度

いずれの機器設定でも、20 個のサンプル溶液それぞれを 3 回測定しました。Cary シッパ―使用の場合、まず、フローセルにサンプル溶液を送液して測定し、次に洗浄溶液に変えて送液後、再び同じサンプル溶液をフローセルに充填しました。この作業を、20 個のサンプルそれぞれで 3 回繰り返しました。3.5 mL のキュベットの場合は、キュベットにサンプルを充填して測定し、キュベット洗浄後、同じサンプルから分取した溶液を充填しました。この作業を、20 個のサンプルそれぞれで 3 回繰り返しました。

表 5 に示すように、いずれの場合でも、薬局方のメソッドで一般的に規定される 2 % をはるかに下回る %RSD 値を示す、高精度の結果が得られました。全 6 測定にわたる %RSD は 0.1869 % でした。

表 5.各機器設定で 20 サンプルを 3 回ずつ測定して得られた吸光度データ。最後の % RSD の列は全 6 測定の精度です。

サンプル	シッパ-使用による測定		キュベット使用の手作業による測定		%RSD n=6
	平均 n = 3 (Abs)	%RSD	平均 n = 3 (Abs)	%RSD	
1	2.2091	0.0775	2.2153	0.0197	0.1470
2	2.4895	0.3394	2.4763	0.0400	0.3313
3	3.8029	0.0462	3.7888	0.1150	0.1988
4	1.5972	0.1706	1.5912	0.0142	0.2119
5	0.7646	0.0991	0.7666	0.0190	0.1435
6	2.4438	0.0372	2.4353	0.0398	0.1766
7	3.0153	0.1773	3.0050	0.0315	0.1997
8	2.1405	0.2443	2.1333	0.0921	0.2277
9	3.6846	0.1805	3.6816	0.0161	0.1121
10	1.0538	0.1516	1.0581	0.0394	0.2241
11	2.4493	0.2714	2.4367	0.0441	0.3037
12	2.4525	0.2948	2.4351	0.0256	0.3941
13	0.8735	0.1588	0.8722	0.0330	0.1209
14	3.1695	0.2032	3.1676	0.0525	0.1248
15	2.7457	0.1754	2.7409	0.0389	0.1364
16	1.7695	0.2143	1.7631	0.0086	0.2186
17	2.0182	0.1966	2.0190	0.0207	0.1160
18	1.7909	0.1568	1.7863	0.1621	0.1818
19	2.3171	0.0425	2.3193	0.0129	0.0539
20	1.1099	0.0229	1.1098	0.1987	0.1157

サンプル定量

各サンプルの 3 回の測定吸光度値の平均と検量線を基に、ランベルト・ベールの法則に従って、各サンプル溶液のビタミン C 濃度を決定しました。さらに、この濃度を基に、測定された各錠剤中のビタミン C 重量を算出しました。結果は表 6 のとおりです。シッパ-設定に基づいて測定した、算出重量とラベルに示された重量との平均差は 1.8 % で、0.5 ~ 5.3 % に及ぶ差がありました。キュベットを使用して測定した、同じサンプル 20 個の平均差は 1.9 % で、0.6 ~ 5.6 % に及ぶ差がありました。これは、錠剤がラベル表示要件を満たしていることを示す、USP (1) 規定のアスコルビン酸錠剤の判定基準 ±10 % 内に十分収まる結果でした。

表 6. 2 つの機器設定で測定して得た、各サンプルの算出濃度。各錠剤のビタミン C 含有量をサンプルの濃度に基づいて算出し、これを、1 錠剤 1000 mg とするラベル表示と比較 (差 %) しました。

サンプル 番号	シッパ-設定			キュベット設定		
	測定濃度 (mg/L)	ビタミン C 算出含有量 (mg)	算出値と ラベル表示 値との差 (%)	測定濃度 (mg/L)	ビタミン C 算出含有量 (mg)	算出値と ラベル表示 値との差 (%)
1	39.00	988.9	1.1	39.12	991.9	0.8
2	44.01	985.1	1.5	43.78	980.0	2.0
3	67.46	1021.3	2.1	67.22	1017.6	1.7
4	28.07	993.6	0.6	27.97	990.2	1.0
5	13.21	1019.7	1.9	13.25	1023.2	2.3
6	43.19	1017.2	1.7	43.05	1013.8	1.4
7	53.40	1023.9	2.3	53.22	1020.6	2.0
8	37.78	968.7	3.2	37.65	965.6	3.6
9	65.35	990.0	1.0	65.30	989.4	1.1
10	18.37	1028.9	2.8	18.46	1033.8	3.3
11	43.29	992.6	0.7	43.07	987.6	1.3
12	43.35	1018.4	1.8	43.05	1011.3	1.1
13	15.15	982.2	1.8	15.13	981.2	1.9
14	56.15	987.1	1.3	56.12	986.6	1.4
15	48.58	995.2	0.5	48.51	993.7	0.6
16	31.15	950.1	5.3	31.05	946.9	5.6
17	35.59	1004.6	0.5	35.62	1005.3	0.5
18	31.53	1028.7	2.8	31.46	1026.3	2.6
19	40.93	992.5	0.8	40.98	993.7	0.6
20	19.37	1024.1	2.4	19.38	1024.4	2.4

測定時間

Cary シッパ-を使用した場合、キュベットの充填を手作業で行う場合と比較して、時間を大幅に節約できました。表 7 に示すとおり、フローセル 3 個とともにシッパ-を使用した場合、同じサンプルを標準のキュベットを使って 1 個ずつ測定する場合に比べ、サンプル 30 個の測定時間を 65 % 短縮できました。シッパ-を使用せずに 3 つのキュベットを同時に測定すると、1 個のキュベットの充填、排出、再充填を 3 回行う場合に比べ、作業時間を 24 % 削減できました。フローセル 3 個とともにシッパ-を使用した場合、3 つのキュベットを手作業で扱って Cary 3500 マルチセル機器で同時に測定する場合に比べ、作業時間を 54 % 削減できました。

表 7. 4 つの異なる設定におけるサンプル 30 個の測定所要時間

測定方法	測定時間 n = 30	時間軽減率 (%) (キュベット 1 個を使用する 手作業による処理との比較)
手作業でのキュベット処理		
1.コンパクトモジュール (サンプルキュベット 1 個)	21 分 30 秒	
2.マルチセルモジュール (サンプルキュベット 3 個)	16 分 26 秒	24 %
シッパ使用 充填時間 (15 秒)、保持時間 (5 秒)、洗浄時間 (15 秒)		
3.フローセル 1 個	19 分 32 秒	9 %
4.フローセル 3 個	7 分 30 秒	65 %

結論

この検討では、UV/Vis 分光光度計での測定のための送液に Cary シッパを使用する場合と、標準のキュベットの手作業による充填および排出を行う場合とを比較しました。シッパは正確であるうえ、手作業による測定に比べて作業時間を 65 %短縮できることが証明されました。

2 つの設定で測定したサンプルの吸光度には、ほぼ差がありませんでした。全 6 設定にわたる %RSD は 0.1869 で、高精度であることを示しています。

標準のキュベットを使用してサンプル 3 個を測定する場合に、3 個すべてを同時に測定できる、Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の同時測定機能を使用すると、作業時間を 24 % 短縮できることが証明されました。

シッパの設定は機器のソフトウェアから制御でき、機器のメソッドの一部として保存できます。これにより、一貫した設定に基づく分析が可能になります。

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, May 1, 2020
5994-1951JAJP
DE.9264236111

Cary シッパを接続した Cary 3500 UV-Vis 分光光度計は、複数の液体サンプルのルーチン測定用機器として最適であることが証明されました。分析時間を短縮し、ワークフローの大幅な時間節約を実現できます。Cary 3500 は測定可能な吸光度範囲が広く、サンプル希釈の必要性を低減できるため、キュベットを使用して手作業でサンプルを測定するよりも格段に正確かつ高精度です。

参考文献

1. Dietary Supplements Compendium, 2019, United States Pharmacopeia, US Government Printing Office: Washington, DC, 2019