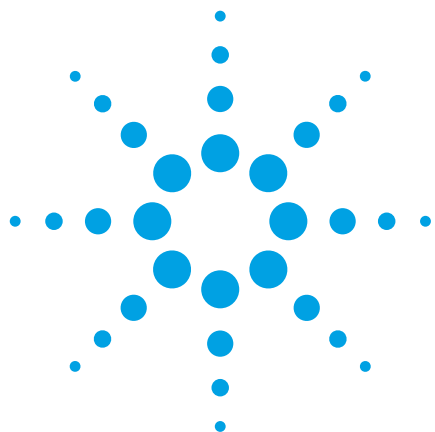




Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた 鉱油分析のための自動クリーンアップ

アプリケーションノート

自動サンプル前処理

著者

Frank David、Karine Jacq、
Bart Tienpont
Research Institute for Chromatography,
President Kennedypark 26,
B-8500 Kortrijk, Belgium

Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808,
USA

概要

水サンプル中の鉱油 (炭化水素油) の測定では、液液抽出後に Florisil を用いて抽出液のクリーンアップを行い、GC-FID で分析します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチシステムを使えば、液液抽出後のサンプルの脱水とクリーンアップを自動化できます。鉱油画分を得るクリーンアップ工程はきわめて効率的に行うことができ、また、鉱油画分に関しては高い回収率と優れた再現性が得られます。抽出液の分析には GC-FID を使用します。LTM (低熱容量) システムを用いた GC との組み合わせにより、高スループットの自動メソッドが実現します。



Agilent Technologies

はじめに

ディーゼル油や潤滑油などの炭化水素オイルによる環境汚染は、GC-FID を用いて測定されます。このメソッドは、炭化水素オイルインデックス (HOI)、鉱油、または全石油系炭化水素 (TPH) の測定にも用いられ、環境分析におけるもっとも重要なアプリケーションのひとつです。水サンプルの前処理では、例えばヘキサンのような沸点 36 °C~69 °C の無極性 (炭化水素) 溶媒による液液抽出 (LLE) から始めます。次に、抽出液を硫酸ナトリウムで脱水させた後、Florisil を通すことで、脂質といった強極性物質を抽出物から除去して、サンプルをクリーンアップします。その後、抽出液に N₂ ガスを吹き付けて濃縮 (または Kuderna-Danish 濃縮装置を利用) し、GC-FID で分析します [1]。

従来のカラムクロマトグラフィーや固相抽出の代わりに分散固相抽出 (d-SPE) を用いれば、クリーンアップ手順を最小化することができます。d-SPE では、少量の吸着剤をサンプルに添加します。マトリックス (この場合では LLE で共抽出された高極性物質) が吸着剤に結合し、溶液から除去されます。クリーンアップの効率を高めるためには、d-SPE の前に抽出液を脱水させる必要があります。

その後、鉱油抽出液を GC-FID で分析します。一般には、膜厚の薄い 10~30 m カラムを使用します。分析時間は 30 分ほどです。最近では、LTM (低熱容量) テクノロジーを用いれば、サンプルスループットが大幅に向上することが実証されています [2]。

このアプリケーションノートでは、Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを用いて、炭化水素オイルインデックスの分析メソッドのうち、脱水および分散固相抽出手順を自動化する方法を紹介します。ワークベンチを使用する前に、LLE で得られた抽出液を、1~1.5 mL ほどに濃縮します (ロータリーエバポレーターや N₂ ガスなどを使用)。その後、硫酸ナトリウムを予め充填したオートサンブラバイアルを用いて、濃縮した抽出液を脱水させます。続いて、Florisil を充填したバイアルでクリーンアップを行います。最終的に得られた抽出液を、LTM テクノロジーを用いた高速 GC-FID で分析します。

実験手法

化学物質と分析用溶液

分析用の鉱油サンプルとして、ディーゼル油と潤滑油の 1:1 混合物 (シクロヘキサン中で各 5,000 µg/mL、cat no 31630、Restek、ベルフオンテ、米国) を使用しました。C10~C40 の偶数の n-アルカン標準物質 (ヘキサン中で各 50 µg/mL、cat no 31678、Restek) は、再現性試験に用いました。

ステアリン酸ステアリル (cat no 31860、Restek) を用いて、ISO 9377 メソッドの記載に従ったクリーンアップ手順の性能を確認しました。アセトンを経過溶媒として 2,000 µg/mL になるように調整しました。

これらのストック溶液から、各 n-アルカン 5 ng/µL とステアリン酸ステアリル 80 ng/µL を含むキャリブレーション溶液をヘキサンで調整しました。また、鉱油 400 ng/µL とステアリン酸ステアリル 80 ng/µL を含むキャリブレーション溶液をヘキサンで調整しました。

ストック溶液から、アセトンを経過溶媒に用いて 2 種類のスパイク溶液を準備しました。第 1 のスパイク溶液には、各 n-アルカン 50 µg とステアリン酸ステアリル 800 µg が添加されています。第 2 のスパイク溶液には、鉱油 4,000 µg とステアリン酸ステアリル 800 µg が添加されています。このスパイク溶液を水サンプル 900 mL に添加し、ヘキサン 50 mL で抽出しました。TurboVap を用いて、ヘキサン抽出液を窒素により 10 mL に濃縮しました。液液抽出の回収率を 100 % と仮定すると、ヘキサン抽出液 10 mL 中の濃度はキャリブレーション溶液と同じになります。この抽出液を複数のバイアルに分け、7696 ワークベンチメソッドの再現性試験を行いました。

無水硫酸ナトリウム (ACS グレード、cat no 23,931-3、Sigma-Aldrich、スタインハイム、ドイツ) を用いて、ヘキサン抽出液を脱水させました。クリーンアップ用の吸着剤には Florisil (cat no 03286-100G-F、Fluka、Sigma-Aldrich) を使用しました。Na₂SO₄ と Florisil はいずれも、予め 140 °C で一晩加熱しました。

まず、硫酸ナトリウム 20 mg (± 2 mg) を 1.5 mL 高回収率バイアルに加えました。このバイアルは Dry とラベルします。別の 1.5-mL 高回収率バイアルには、Florisil 30 mg (± 2 mg) を加えました。このバイアルは Clean-up とラベルします。すべてのバイアルにスクリュキャップで蓋をし、吸湿を防ぎました。

サンプル前処理

水サンプルのヘキサン抽出液を 1.5 mL 高回収率バイアルに入れ (Sample とラベルします)、ワークベンチのトレイに配置しました。無水硫酸ナトリウム 20 mg を含む Dry バイアルと、Florisil 30 mg を含む Clean-up バイアル、200 µL インサートを備えた空のバイアル (Final とラベルします) もトレイに配置しました。

フロントタワーに 500 µL シリンジ、バックタワーに 250 µL シリンジを設置しました。シリンジ洗浄にはヘキサンを用いました。

7696 ワークベンチのリソースレイアウト例を図 1 に示します。Dry、Clean-up、Final バイアルの配置位置が反映されています。

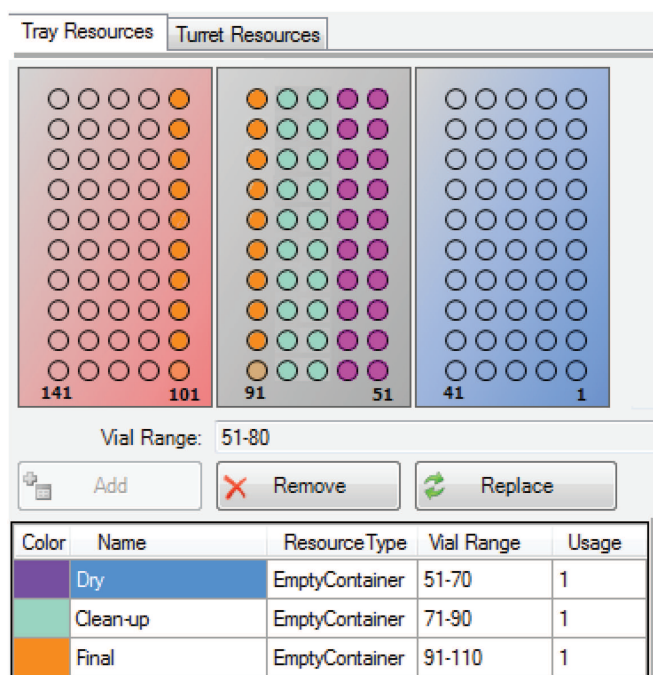


図 1. Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチのリソースレイアウト

このワークベンチメソッドをまとめると、以下のようになります (コマンドを太字、コメントを細字で記載)。

1. **フロントタワーで Sample 500 µL を Dry に添加**
(抽出液のアリコート硫酸ナトリウムに添加)
2. **Dry を 1 分間混合**
(2,000 rpm、双方向、4 秒オン、1 秒オフ)
(混合により、サンプルと吸着剤を十分に接触させ、水分を除去)
3. **バックタワーで Dry 350 µL を Clean-up に添加**
(脱水抽出液のアリコートを Florisil に添加)
4. **Clean-up を 1 分間混合**
(2,000 rpm、双方向、4 秒オン、1 秒オフ)
(混合により、サンプルと吸着剤を十分に接触させ、極性物質を除去)
5. **バックタワーで Clean-up 150 µL を Final に添加**
(クリーンアップ後の抽出液を GC-FID 分析用のバイアルに移動)
6. **Final に結果フラグを立てる**
(前処理の終了したバイアルの位置を表示)

機器構成

分析には Agilent 7890 GC システムを使用しました。この GC は、SSL 注入口、LTM II オープンドア、FID を搭載しています。分離には 0.32 mm x 10 m、0.10 µm DB-5HT カラム (製品番号 123-5701LTM) を使用しました。

分析条件を表 1 にまとめています ([2] も参照)。

表 1. 分析条件

注入	1 µL、スプリットレス (パージ開始時間 0.4 分) 350 °C スプリット/スプリットレスライナ (製品番号 5183-4647)
キャリア	ヘリウム、9 mL/min コンスタントフロー
GC オープン温度	340 °C 一定
LTM	40 °C (0.5 min) – 200 °C/min – 240 °C – 100 °C/min – 340 °C (0.5 min) 分析時間: 3 分
FID	340 °C、H ₂ 40 mL/min、空気 400 mL/min

結果と考察

水サンプル中鉱油の測定の最初の手順は、液液抽出です。一般に、溶媒 50 mL (ヘキサン) を用いて大量のサンプル (900 mL) を抽出します。この手順は自動化できないため、従来の方法で行います。その後、得られた抽出液を濃縮します (例えば、Zymark 製 TurboVap を用いて窒素で乾燥させます)。濃縮したサンプル (1~2 mL) を 2 mL オートサンブラバイアルに移した後は、残りの工程を 7696 サンプル前処理ワークベンチが処理します。

Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチで行われるサンプル前処理手順を図 2 に示します。最初のステップでは、ヘキサン抽出液のアリコートを硫酸ナトリウムで脱水させます。微量の水でも次のクリーンアップの性能を低下させるため、このステップは重要となります。その後、脱水抽出液のアリコートを、Florisil を入れたバイアルに移します。Florisil 吸着剤は、140 °C で活性化させ、残留する水を除去する必要があります。また、必要最小限の Florisil の量を確認するための試験も実施しました。使用量が 20 mg 未満の場合は、十分なクリーンアップ効率が得られませんでした。余裕をみて 30 mg (± 2 mg) が妥当な量であると判断しました。

Florisil 抽出液を攪拌した後、アリコートをした空のバイアルに移します (200- μ L インサート装備)。この抽出液を高速 GC-FID で分析します。バイアルには抽出液 150 μ L が入っているため、必要に応じて、このメソッドを大量注入と組み合わせることもできます。

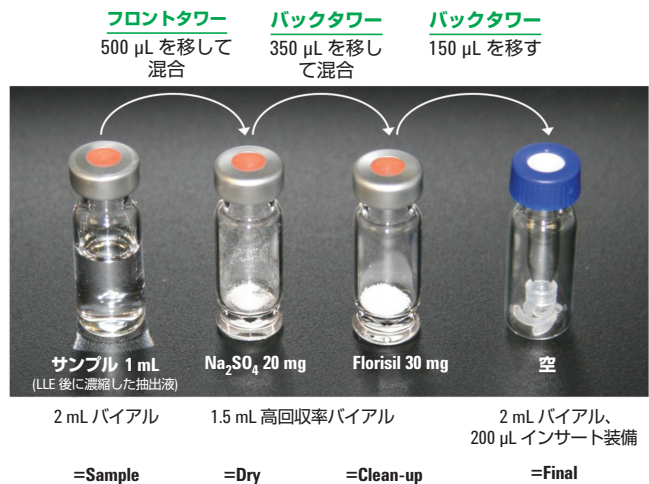


図 2. ワークベンチでの各ステップにおける 2 mL バイアルの写真

1. 濃縮後のヘキサン抽出液
2. Na₂SO₄ への抽出液の移動後 (脱水)
3. Florisil への抽出液の移動後
4. 最終抽出液

鉱油サンプルで得られた代表的なクロマトグラムを図 3 に示します。上図は、脱水・クリーンアップを行っていないサンプル (抽出液中 400 μ g/mL) から得られたクロマトグラムを示しています。鉱油サンプルには、一定量のステアリン酸ステアリル (抽出液中 80 μ g/mL) が添加されています。この化合物 (より極性の高いマトリックスの模倣剤として使用) は、C38 前後で溶出します。

脱水・クリーンアップを行ったサンプル (理論上は図 3 上図と同じ濃度) で得られたクロマトグラムを図 3 下図に示しています。鉱油に対して同じ分離プロファイルが得られていることが明らかにわかります。ステアリン酸ステアリルは、ほとんど (ピーク面積が脱水・クリーンアップしていないサンプルの 5 % 未満) 除去されています。

再現性を評価するため、ヘキサン中にアルカン (5 μ g/mL) とステアリン酸ステアリル (80 μ g/mL) を含む 6 つのサンプルに、Agilent 7696 ワークベンチメソッドを適用しました。表 2 に、4 つの n-アルカンおよびステアリン酸ステアリルのピーク面積を示しています。RSD は概ね 1 % 前後でした (C40 は 2.5 %)。回収率 (脱水・クリーンアップを行ったサンプルと行っていないサンプルのピーク面積比) は 80 % を上回りました。ステアリン酸ステアリルの回収率は 1.9 % (n=6 の平均) で、5 % を大きく下回りました。

表 2. n-アルカンおよびステアリン酸ステアリルのピーク面積の再現性 (n = 6) と、脱水・クリーンアップの有無を対比した回収率

化合物	平均レスポンス	SD	RSD (%)	回収率 (%)
C10	58.1	0.542	0.93	99.6
C20	62.7	0.612	0.97	99.8
C30	60.4	0.656	1.09	101.1
ステアリン酸ステアリル	16.0	2.792	(17.5)	1.9
C40	50.5	1.293	2.56	86.4

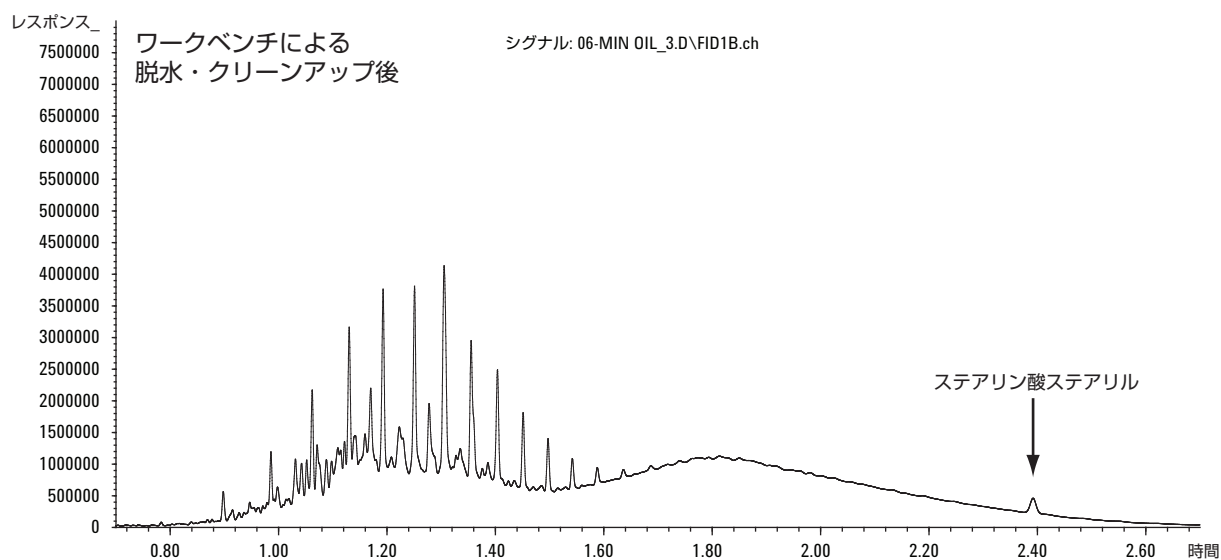
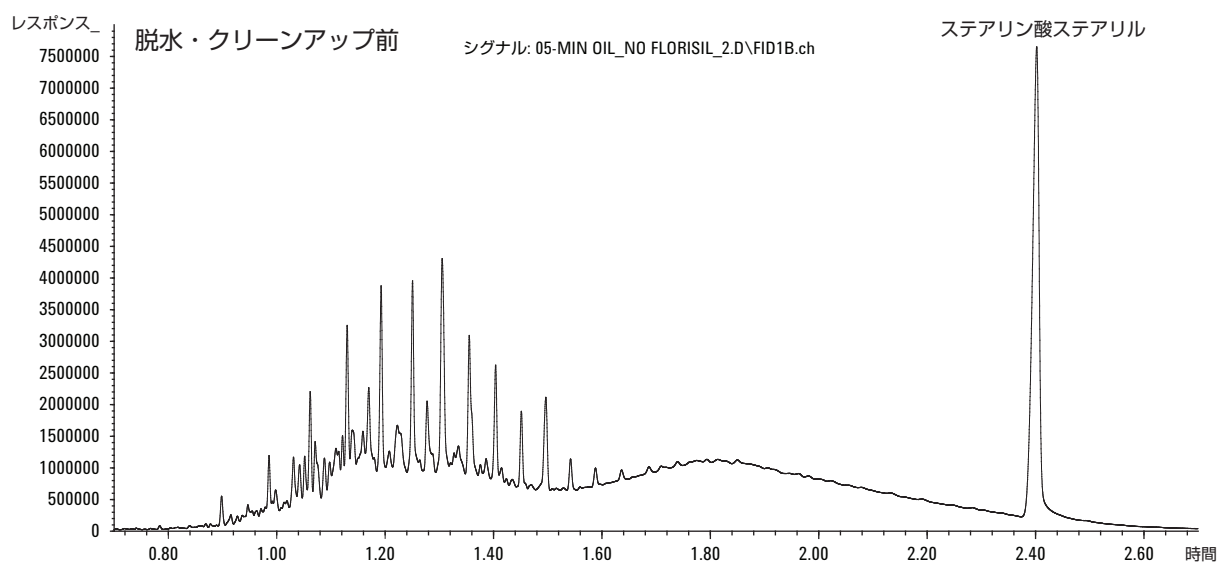


図 3. 石油系オイル 400 ng/μL とステアリン酸ステアリル 80 ng/μL の GC-FID クロマトグラム。上図：ヘキサン抽出物の脱水・クリーンアップ前、
下図：Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチシステムによるヘキサン抽出物の脱水・クリーンアップ後

鉱油 (400 µg/mL) とステアリン酸ステアリル (80 µg/mL) を含むヘキサン抽出液で、同じように再現性と回収率を評価しました。結果を表 3 にまとめます。

このデータは、鉱油ピークの面積和の再現性が全体的にきわめて優れている (RSD < 1 %) ことと、ステアリン酸ステアリルが効率的に除去されている (平均回収率 = 2.3 %, つまり 5 % 未満) ことを明らかにしています。鉱油画分の回収率は、95 % を上回りました (基準値 : 80 % < 回収率 < 110 %)。

表 3. 鉱油およびステアリン酸ステアリルのピーク面積の再現性 (n = 10) と、脱水・クリーンアップの有無を対比した回収率

	ピーク面積		回収率 (%)	
	鉱油	ステアリン酸ステアリル	鉱油	ステアリン酸ステアリル
脱水・クリーンアップなし	9342.0	895.4		
1	9760.9	20.6	104.5	2.3
2	9745.4	20.6	104.3	2.3
3	9602.1	19.7	102.8	2.2
4	9839.3	16.4	105.3	1.8
5	9841.8	23.0	105.3	2.6
6	9704.5	18.1	103.9	2.0
7	9800.4	16.6	104.9	1.8
8	9745.4	23.0	104.3	2.6
9	9735.6	19.6	104.2	2.2
10	9658.4	31.6	103.4	3.5
平均	9743.4	20.9	104.3	2.3
標準偏差	75.4		0.8	
RSD (%)	0.77		0.77	

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチシステムを用いて、水サンプル中鉱油の測定における分散固相抽出クリーンアップメソッドを自動化しました。液液抽出によるヘキサン抽出物を脱水させ、クリーンアップしました。得られた抽出液を GC-FID で分析しました。

このメソッドでは、鉱油画分において高い回収率と優れた再現性が得られると同時に、クリーンアップもきわめて効率的に行うことができます。LTM (低熱容量) GC との組み合わせにより、高スループットのメソッドが実現します。

参考文献

1. International standard ISO 9377-2, Water Quality, Determination of hydrocarbon oil index, part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography, 2000.
2. F. David, K. Jacq and R.L. Firor, Agilent LTM II (Low Thermal Mass : 低熱容量) システムを用いたハイスループット鉱油分析、9/2011、アジレント・テクノロジー
資料番号 5990-9104JAJP

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。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan

October 11, 2011

5990-9163JAJP



Agilent Technologies