

ピペットで精度よく分注するために

—電動ピペット MPA シリーズを利用した特殊液体の分注について—

はじめに

ピペットの精度管理には、精製水が利用されますが、実際の使用現場では、粘性が高い、揮発性がある、強い酸性を示す、などの液体の分注作業がピペットを利用して行われています。そこで、本資料では、これらの液体を分注する際のピペットの操作方法と、有機溶剤に対する耐性などについてまとめました。

—目次—

1. 粘性のある液体の分注
 - 1-1 対応方法
 - 1-2 詳細説明
 - 1-3 粘性のある液体の測定結果
2. 揮発性のある有機溶剤の分注
 - 2-1 有機溶剤に対する耐性
 - 2-2 有機溶剤の分注方法
 - 2-3 詳細説明
 - 2-4 有機溶剤の分注結果
3. 酸性液体の分注
 - 3-1 酸性液体に対する耐性
 - 3-2 酸性液体の分注結果
4. チップの互換性
 - 4-1 チップ内フィルターの有り／無しによる分注量の差
 - 4-2 MPA と各種チップの適合
5. 測定データの付録
 - 5-1 醤油の分注

1. 粘性のある液体の分注

1-1 対応方法

粘性のある液体は、一般にチップに付着しやすく、正確な分注（吸引・排出）が難しくなります。これら粘度の高い液体を正確に分注したい場合は、以下の対応をお勧めします。

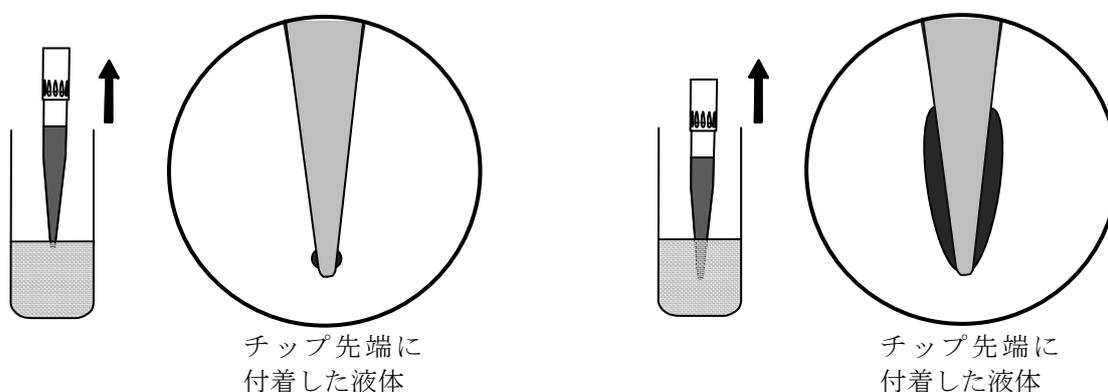
- (1) 液体吸引時、チップを液体に深く入れない
- (2) 液体吸引時、吸引動作終了後もチップを液体に入れた状態で、数秒待つ
- (3) 先端径の広いチップを利用する(チップ先端をカットするなど)
- (4) 排出時のスピードを遅くする
- (5) リバースモードを利用する

1-2 詳細説明

- (1) 液体吸引時、チップを液体に深く入れない

吸引する液体がチップ外周に付着すると、付着した液体が排出時に一緒に分注されることがあり、分注量の誤差につながります。

吸引時、チップ先端を液体に入れる深さを最低限にすることで、チップ外周に付着する液体の量を少なくすることができ、分注量の誤差が減少します。



(2) 液体吸引時、吸引動作終了後もチップを液体に入れた状態で、数秒待つ

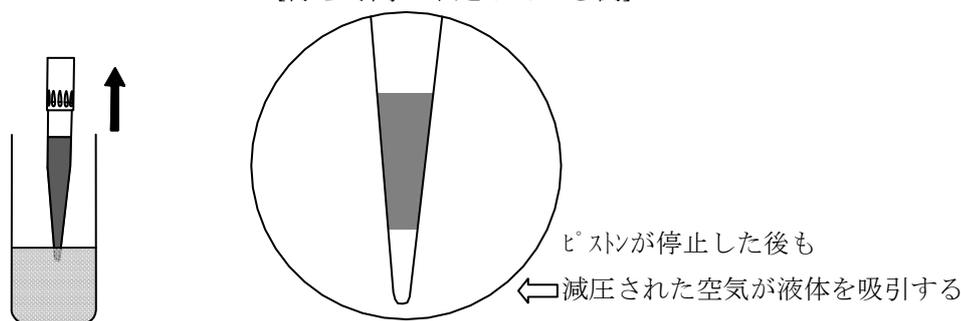
液体の吸引時は、ピストンが上昇することで液体とピストン間の空気が減圧され、液体をチップ内に吸引します。

粘性がある液体の場合、ピストンが停止した後も、減圧された空気が定常状態になるまでに少しずつ液体を吸引し、チップ内の液面が上昇していく現象がみられます。

規定量を正確に吸引するため、チップ内の液体の上昇が停止するまでは、チップ先端を液体に入れた状態で、数秒間維持してください。

チップを液体から離れた直後にチップ先端に空気が入る場合は、内部の空気がまだ定常状態になっていないので、チップを液体に入れておく時間を延ばしてください。

[待ち時間が不足している例]



(3) 先端径の広いチップを利用する(チップ先端をカットするなど)

吸引・排出時の液体の移動は、チップ先端の小径部が最大の抵抗となります。

粘性の高い液体はこの抵抗が増えますので、チップ先端の径を広くする(チップ先端をカットする、広径のチップを使用する)ことにより、吸引・排出時の抵抗を減らすことができ、より設定量に近い分注が可能となります。

ただし、先端の径が広がることにより、先端に液体が付着しやすくなるため、分注量は増える傾向になります。(グラフ 1 参照)。

[MPA-200 の場合]

A&D 標準チップの先端をカットした時の分注量差

	10mmカット	15mmカット
先端径	φ 1.36mm	φ 1.88mm
200 μL	1.1 uL	1.6 uL
10 μL	0.6 uL	1.6 uL

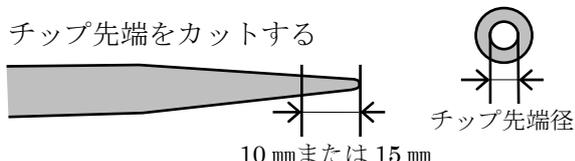
※標準チップ(カットなし)は先端径φ 0.54 mm

※精製水を分注

※分注量差=

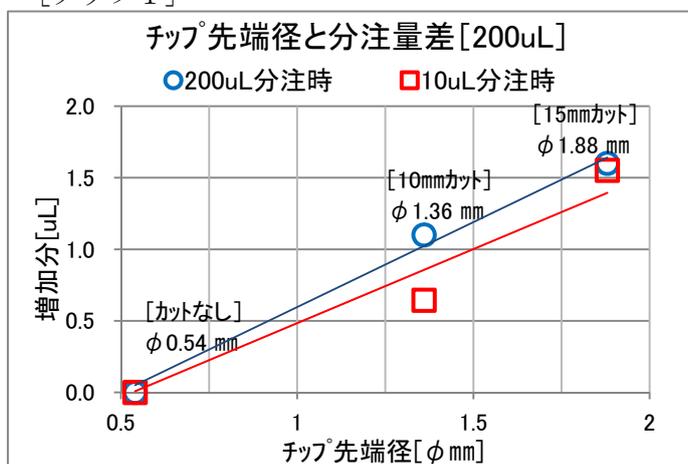
(カットしたチップでの分注量)-(標準チップでの分注量)

チップ先端をカットする



※MPA-200 で A&D 標準チップ 200uL 用を使用し、200uL と 10uL を測定

[グラフ 1]

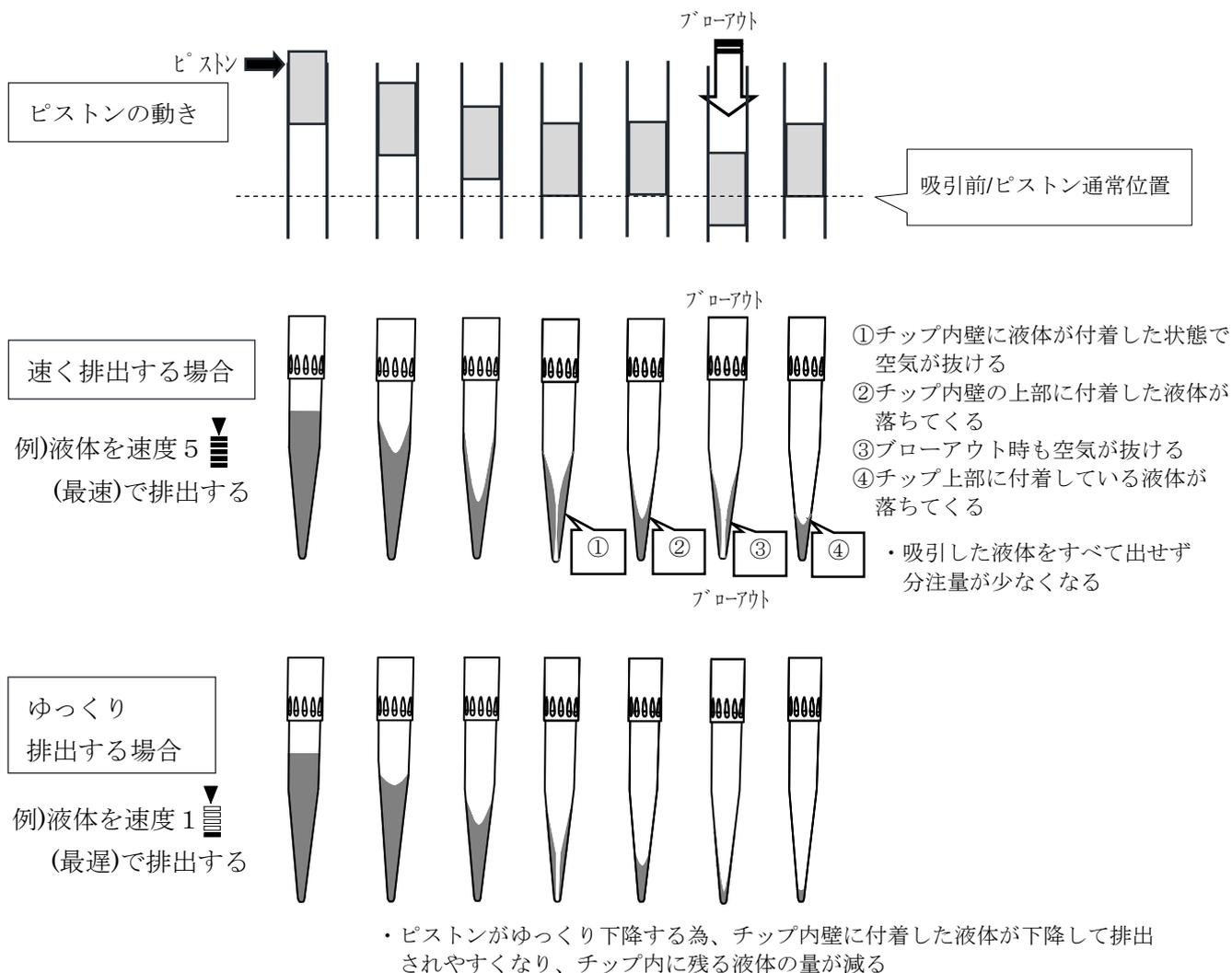


(4) 排出時のスピードを遅くする

粘性のある液体はチップに付着しやすく、チップ内に吸引した液体を排出する場合、チップ内壁に接触している部分の液体は、ゆっくりと下降する現象が見られます。

また、排出時の動作は、ピストンが下降し空気が圧縮され、液体をチップ内から排出します。そのため、排出スピードが速いと、チップ内壁に付着した液体が下方に落ちる前に空気が排出されてしまい、チップ内部の液体が排出されず、分注量が少なくなります。

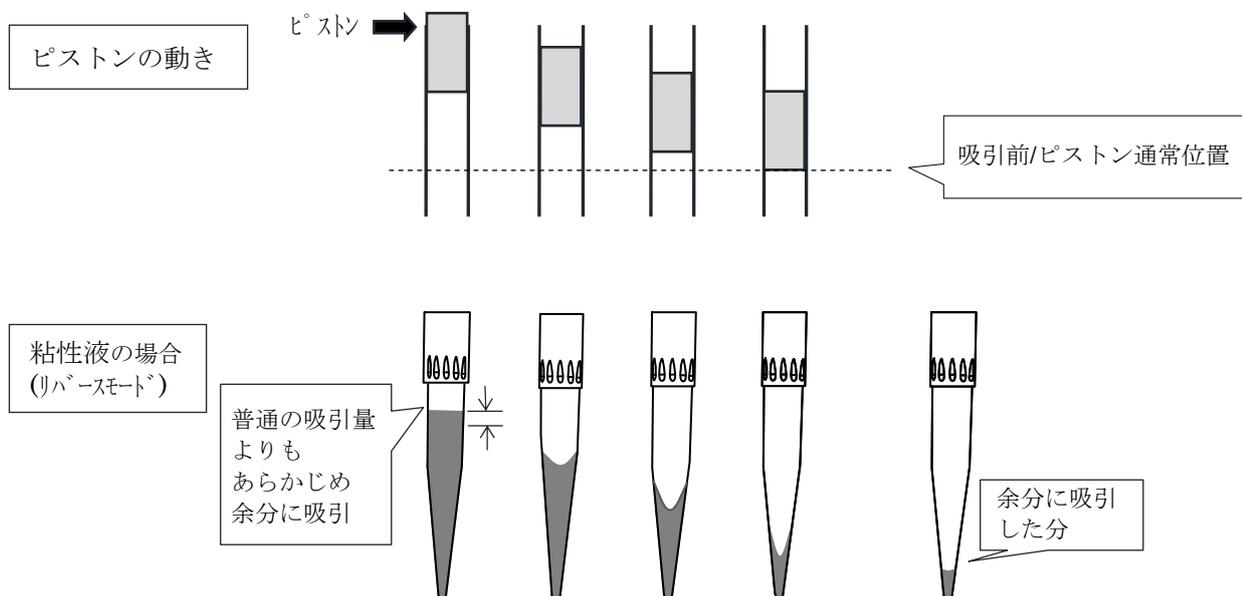
排出スピードを遅く設定するとより、排出時の空気の圧縮が遅くなり、チップ内の液体の下降時間に余裕が出て、空気が排出されにくくなります。



(5) リバースモードを利用する

あらかじめ規定量よりも余分に吸引し、排出時に定量を排出する方法です。

あらかじめ余分に吸引することにより、チップ内壁に液体が付着しても空気が排出され難く、規定量の分注が容易になります。



1-3 粘性のある液体の測定結果

以下に MPA-200 を使用し、粘度の異なる各種液体(増粘剤/グリセリンの水溶液)を分注したときの分注結果を示します(グラフ 2~グラフ 4 参照)

吸引・排出スピードを最速/最遅、分注方法を通常のプロローアウト(*1)/リバースモード(*2)の組合せで各種液体を分注したものです。

吸引・排出スピードを遅くし、リバースモードを使用した方が、粘度の高い液体まで正確に測定でき、増粘剤の水溶液においては、**20mPa・s** 程度までの粘度であれば、分注方法を工夫することで、精度良く分注できることが分かります。

- *1 **プロローアウト**：規定量を吸引し、吸引したすべての液体を排出することを目的とした方式。
すべての液体を排出するため、吸引開始の位置よりもさらに下方にピストンを突出させること。
(手動ピペットでは第 2 ボタンまで押し込む動作)
- *2 **リバースモード**：あらかじめ規定量よりも多めに吸引し、排出時に規定量を排出するようにした動作。

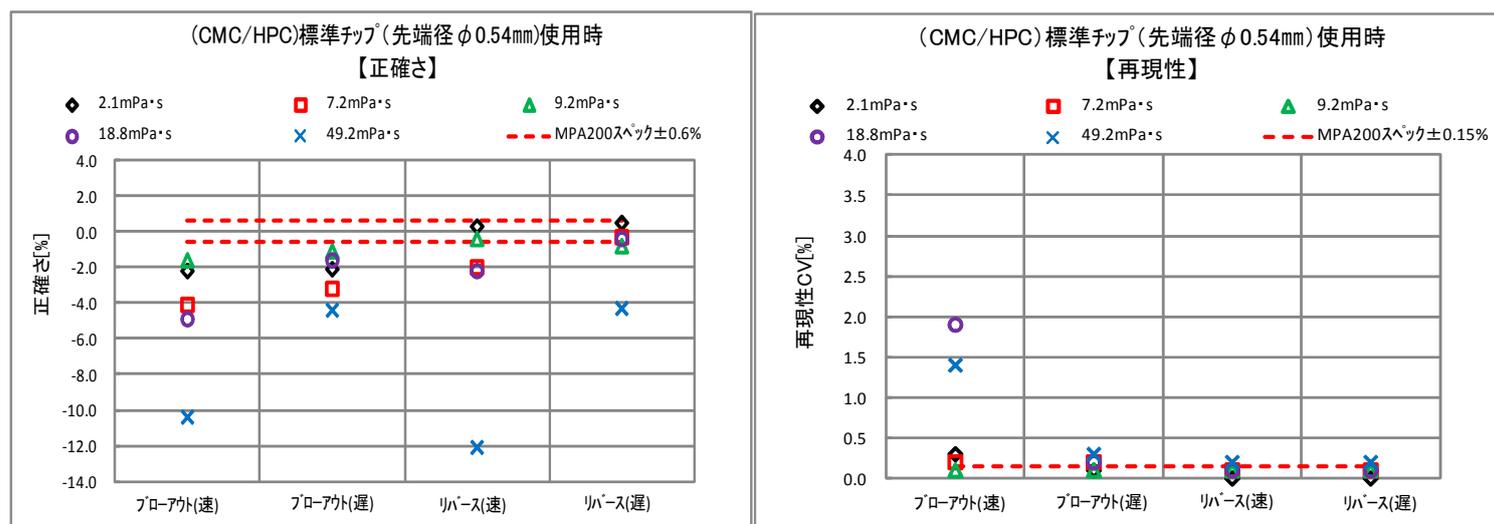
1) 増粘剤水溶液の測定結果

増粘剤詳細： HPC(ヒドロキシプロピルセルロース)

CMC(カルボキシメチルセルロースナトリウム)

増粘剤 材料	濃度	粘度
HPC2.0	2.0%	2.1mPa・s
HPC6.0-10.0	2.0%	7.2mPa・s
CMC	0.2%	9.2mPa・s
CMC	0.5%	18.8mPa・s
CMC	1.0%	49.2mPa・s

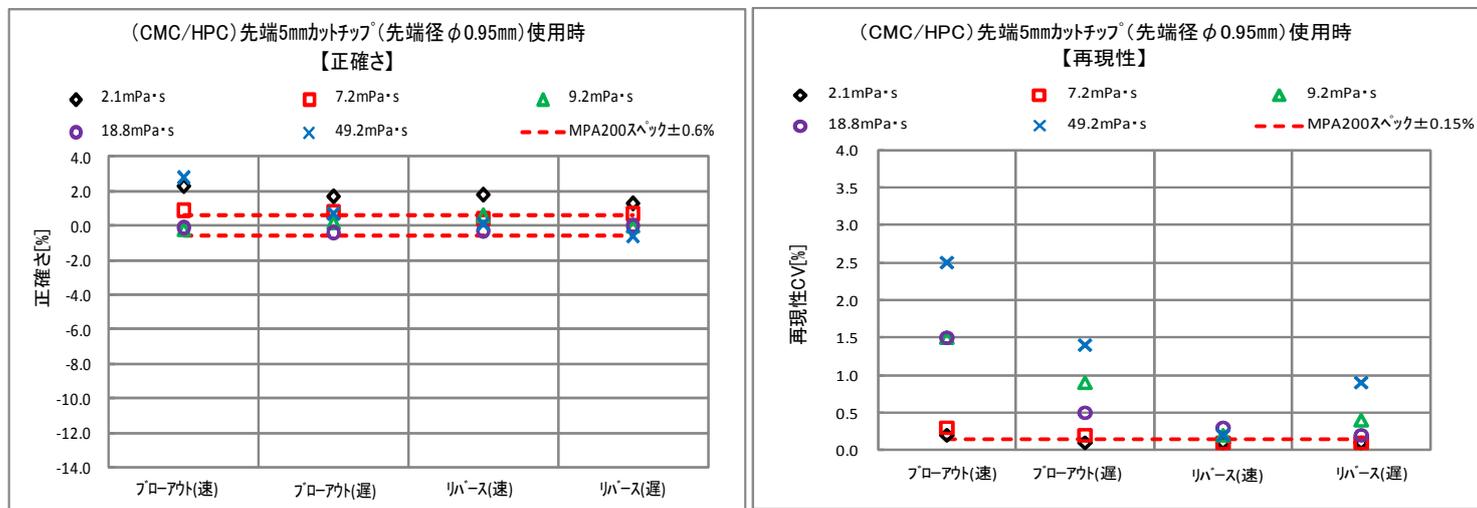
[グラフ 2] MPA-200 で 200uL を分注



また、粘度が約 50mPa・s になると、液体の排出前に空気が排出され、分注量が少なくなります。

約50mPa・sの粘性液でも、チップ先端をカットすることにより、排出時の抵抗を減らすことができ、分注量の精度が改善されますが、再現性は悪化する結果となります。(グラフ 3 参照)

[グラフ 3] MPA-200 で 200uL を分注

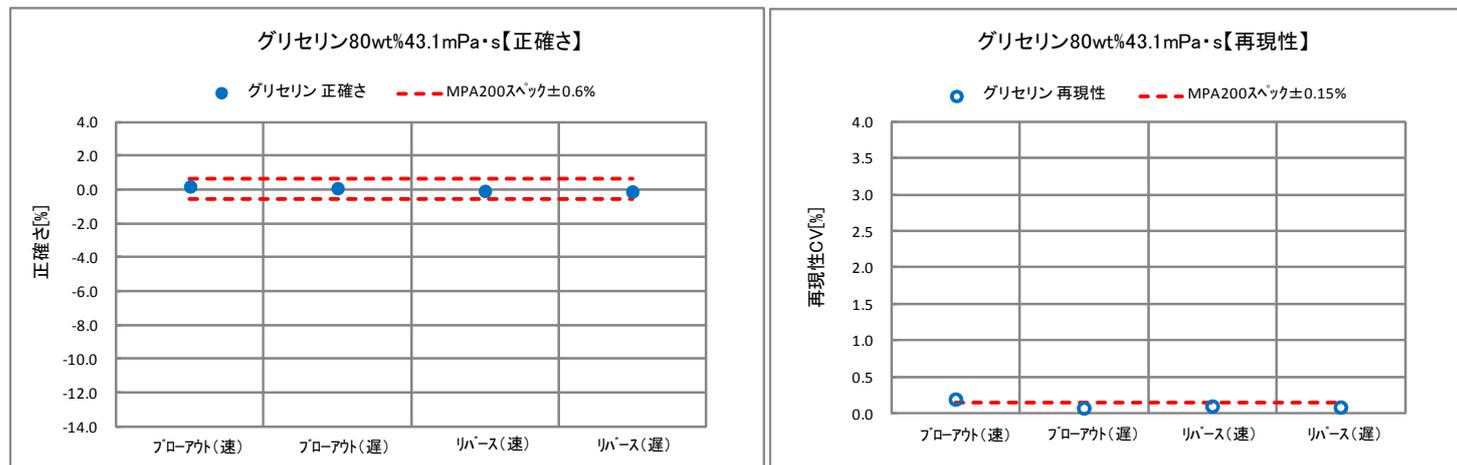


2) グリセリン水溶液の測定結果

グリセリン水溶液(80%濃度、約 43.1mPa・s)は、増粘剤を利用した粘性液(CMC1.0%濃度水溶液の約 49.2mPa・s)とほぼ同程度の粘度となりますが、精度良く分注できています。

これは、グリセリン水溶液は、チップ(ポリプロピレン製)に付着しにくく、排出時においてチップ内に液体が残りやすい性質であるためと判断されます。(グラフ 4 参照)

[グラフ 4] MPA-200 で 200uL を分注

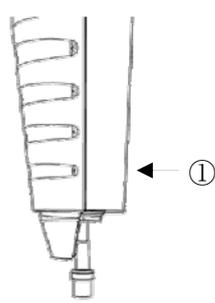
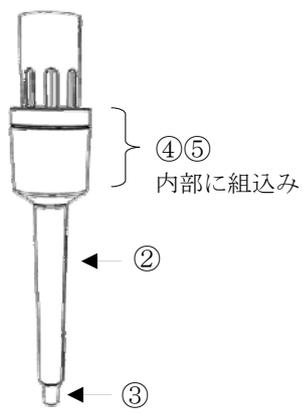
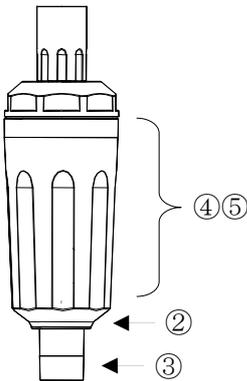


2. 揮発性のある有機溶剤液の分注

2-1 有機溶剤に対する耐性

ピペット本体の材質は、以下のようになっています。

番号	名称	[MPA-10/20/200/1200]材質	[MPA-10000]材質
①	本体	ABS (アクリロニトリル ブタジエン スチレン)	ABS (アクリロニトリル ブタジエン スチレン)
②	チップ イジェクタ	PP+GF20% (ポリプロピレン、 グラスファイバー20%入り)	PP+GF20% (ポリプロピレン、 グラスファイバー20%入り)
③	チップ ホルダ	PVDF (ポリフッ化ビニリデン、 フッ素系樹脂)	PVDF (ポリフッ化ビニリデン、 フッ素系樹脂)
④	ピストン	SUS303 (グリース塗布タイプ)	
⑤	O リング	NBR (ニトリルゴム)	NBR (ニトリルゴム)

MPA 本体	ロアパーツ	
	[MPA-10/20/200/1200]	[MPA-10000]
		

液体の吸引・排出は、空気を介して行いますので、有機溶剤を扱う場合も、直接液体に触れるのはチップのみとなります。

吸引後は、有機溶剤のガス化した揮発成分が、ピペットの内部構造と接触します。

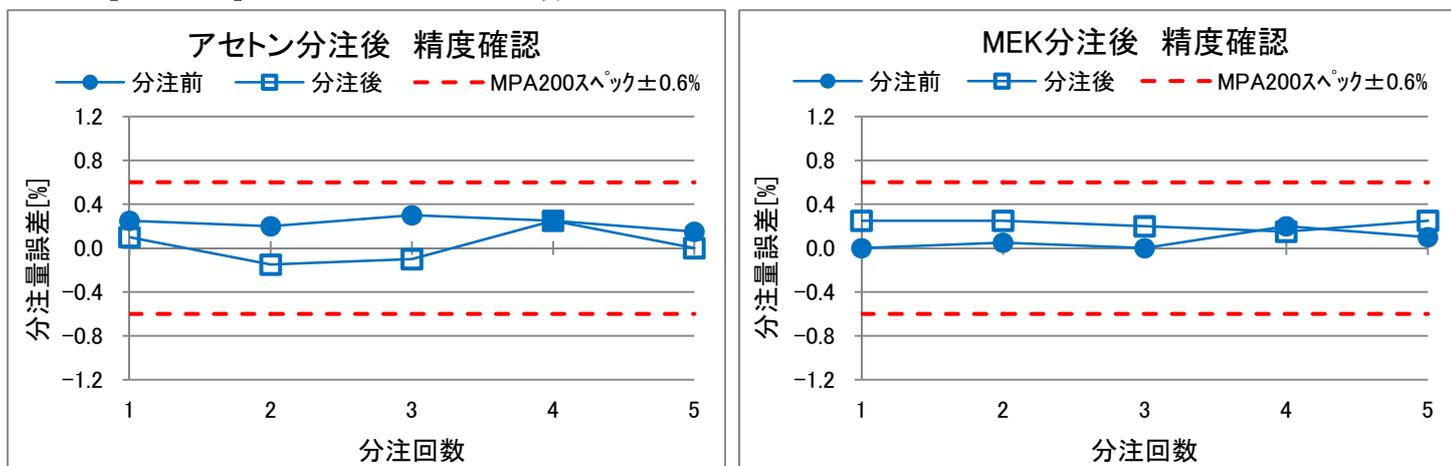
液体が直接触れるチップは PP(ポリプロピレン)ですので、一般的な有機溶剤に対して耐性があり、チップ自体も簡単に取換えが可能です。

また、チップに吸引した有機溶剤の揮発成分がピペットにガスとして接する部分として、チップホルダ、ピストン、O リングがあります。チップホルダはフッ素樹脂：PVDF で耐薬品性に優れたものであり、ピストン、O リングは、耐薬品性の高いフッ素系グリスでコーティングされています。従って、有機溶剤の分注に対しても、MPA は一定の耐性を持っています。

溶剤に接液したり、溶剤の蒸気にさらされる部分はロアパーツ (ユニット) として、ユーザで簡単に交換することができます。

[グラフ5] は、アセトン、MEK(メチルエチルケトン)の分注を 200 回行った後、ピペットの精度に影響があるか否かを確認した結果です。

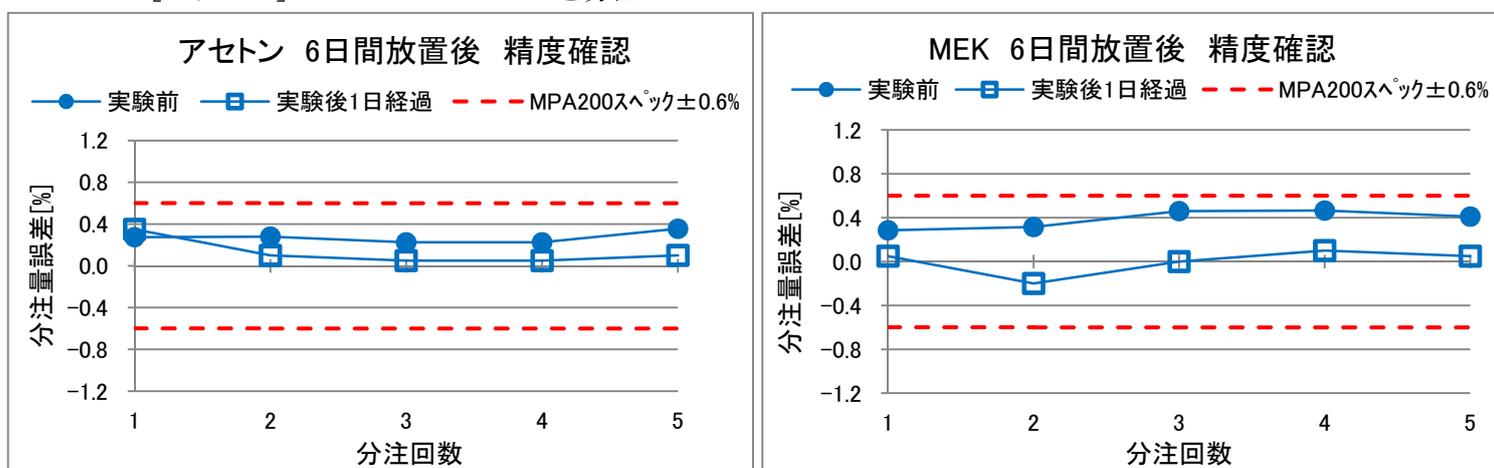
[グラフ5] MPA-200 で 200 μ L を分注



※有機溶剤分注後は、半日～1日放置してから精度確認を実施

[グラフ6] は、アセトン、MEK を吸引した状態のまま、ピペットスタンドに掛けて6日間放置し、その後、精製水でピペットの精度を確認した結果です。

[グラフ6] MPA-200 で 200 μ L を分注



※チップ内の溶剤を排出後、1日放置してから精度確認を実施

※MPA-10000 の実験では、実験開始3日後にアセトンが完全に揮発し、2日後に MEK が完全に揮発しています。この為、放置時間は3日間とし、その後1日経過後に精度の確認をしました。

これらの結果から、アセトンや MEK など、強い有機溶剤を使用しても、短期的には精度の劣化は認められませんでした。

同様の実験を MPA-10000 で行い、精度に影響がないことを確認しています。

2-2 有機溶剤の分注方法

揮発性のある液体の分注は、吸引した液体の揮発によりピペット内部の空気の体積に影響を与えます。精度よく分注したい場合は、分注直前に十分なプレリンス(*1)を行ってください(5回以上)。

*1 分注する液体を使用し、吸引・排出を繰り返し行うこと。

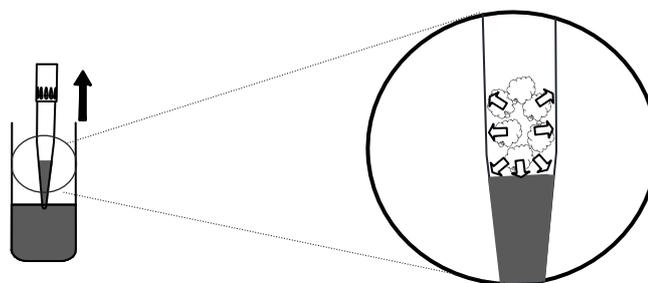
2-3 詳細説明

液体の吸引・排出は、ピペット内部のピストンと液体間の空気の圧力を介して行います。吸引時または吸引後に、液体が揮発(気化)すると、ピペット内の空気の圧力が上昇し、その圧力が液体を押し下げることで、規定量を吸引できない現象が発生します。(図1参照)

この結果、揮発する液体を吸引したときに、チップ先端から液が垂れる現象が確認されます。

分注直前に、プレリンス(事前に分注する液体で吸引・排出を行う)を繰り返し行うことにより、ピペット内の空間が飽和状態となり、吸引される液体の気化を防ぎ、正確な分注が可能になります。

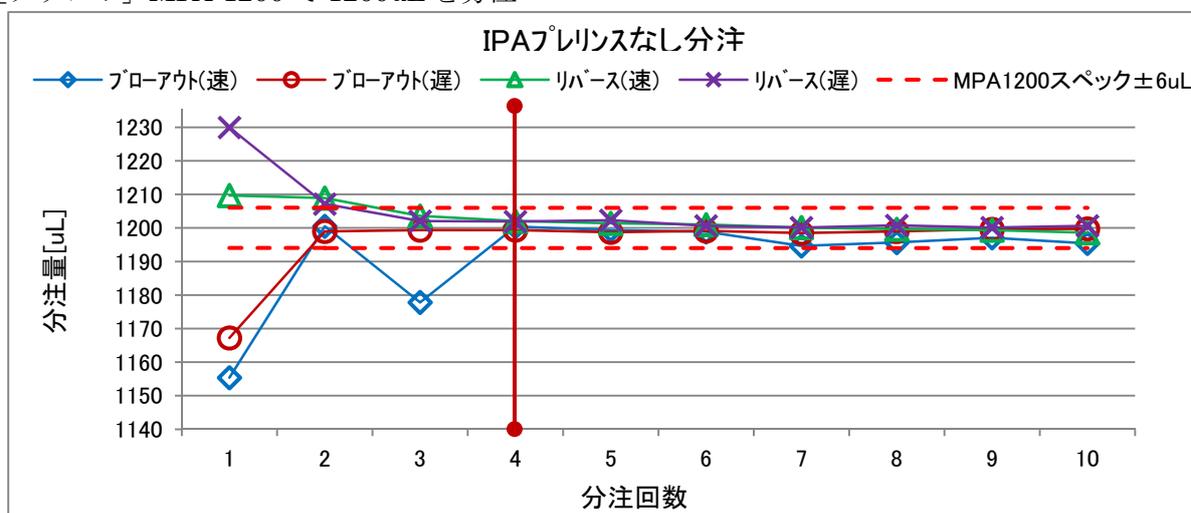
[図1]



2-4 有機溶剤の分注結果

[グラフ7]は、揮発性の高いIPA(イソプロピルアルコール)を事前のプレリンスを行わずに分注を繰り返し行った結果です。分注開始直後は、分注量が安定せず、4回目以降の分注から、分注結果が安定してくることが分かります。従って、正確な分注の為に、分注の前に最低でも3回のプレリンスが必要であることが分かります。

[グラフ7] MPA-1200で1200 μ Lを分注



[グラフ8] は、揮発性の高いアセトン、MEK(メチルエチルケトン)をプレリンスを行わず、そのまま分注を繰り返した結果です。

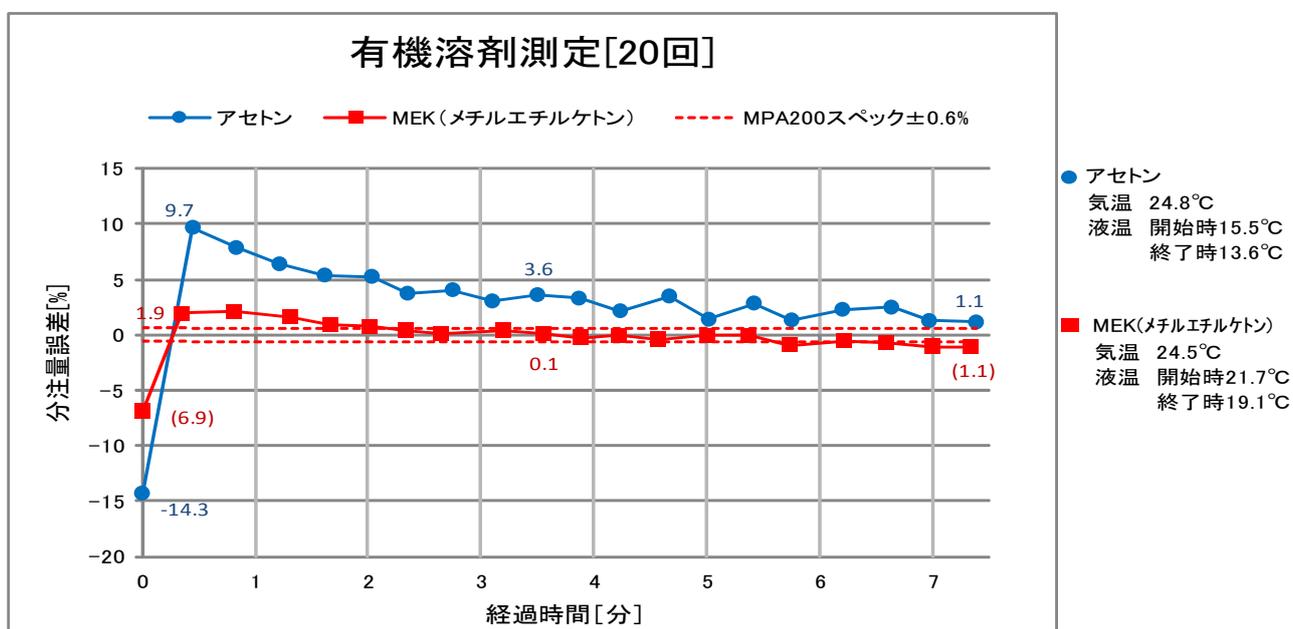
揮発し易さは、アセトンが水の10倍、MEKが水の4倍であり、周囲温度に対しては、アセトンは約10℃、MEKは約5℃低くなっています。

アセトン、MEKとも最初は分注量が少なく、その後分注量が増え、最終的には分注量が規定値(200uL)に近づきます。

これは、溶剤が揮発することによりピペット内の空気の圧力が高まり、吸引量が減り、初回分注量の減少傾向が見られます。2回目以降の増加は、チップ内が溶剤の揮発で冷やされた結果、圧力が下がり、分注量の増加傾向が続いたと推測されます。

いずれにしても、揮発性が高く、また温度が異なる液体を正確に分注する場合は、分注直前に十分なプレリンスが必要なことが分かります。

[グラフ8] MPA-200で200uLを分注



3. 酸性液体の分注

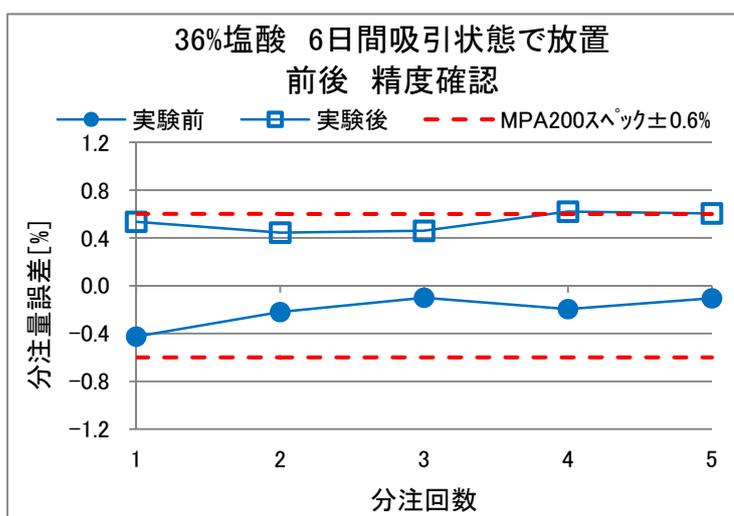
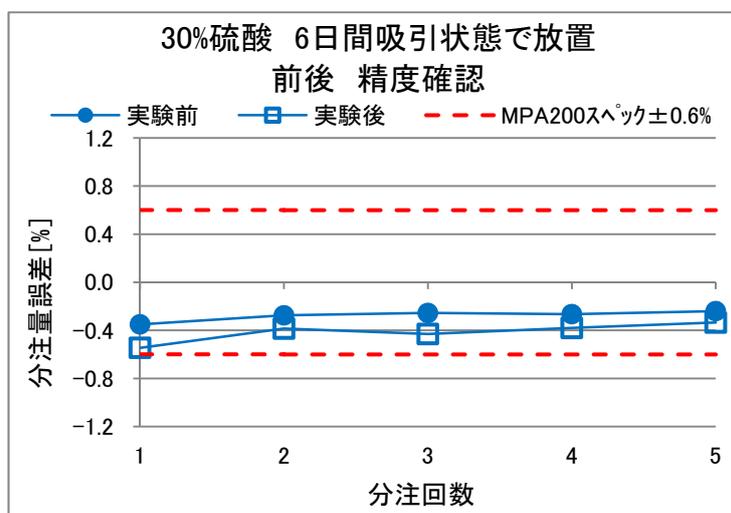
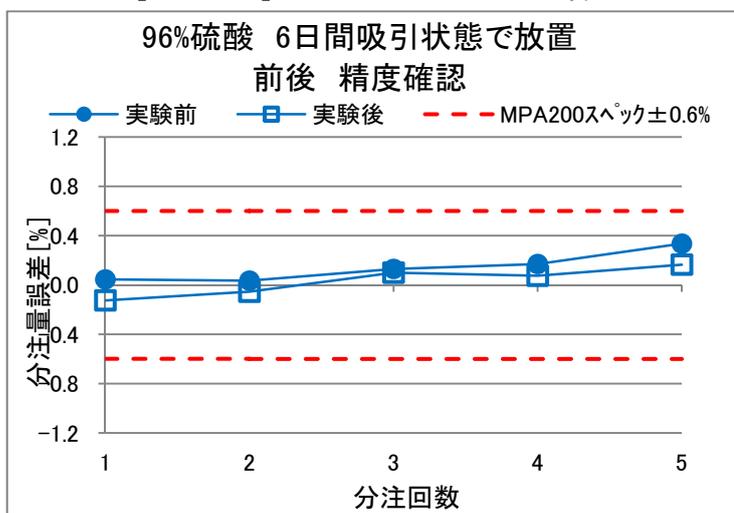
3-1 酸性液体に対する耐性

以下に MPA-200 を使用し、チップ内に酸性液を吸引した状態のまま、ピペットスタンドに掛けて 6 日間放置し、その前後に精製水でピペットの精度を確認した結果を示します。(グラフ 9 参照)

使用酸性液について

- ・ 96%硫酸 (濃度 96%の原液を使用、粘度 23mPa・s)
- ・ 30%硫酸 (濃度 96%を精製水で希釈)
- ・ 36%塩酸 (35~37%の試液を使用)

[グラフ 9] MPA-200 で 200uL を分注



硫酸 (96%、30%) に対してはピペット本体の劣化は認められず、精度にも影響を及ぼさないことを確認しました。

塩酸 (36%) の耐性試験では、ロアパーツ (チップホルダ先端) と本体内部のピストンが黄色く変色しましたが、実験後の精製水による精度確認では問題は有りませんでした。

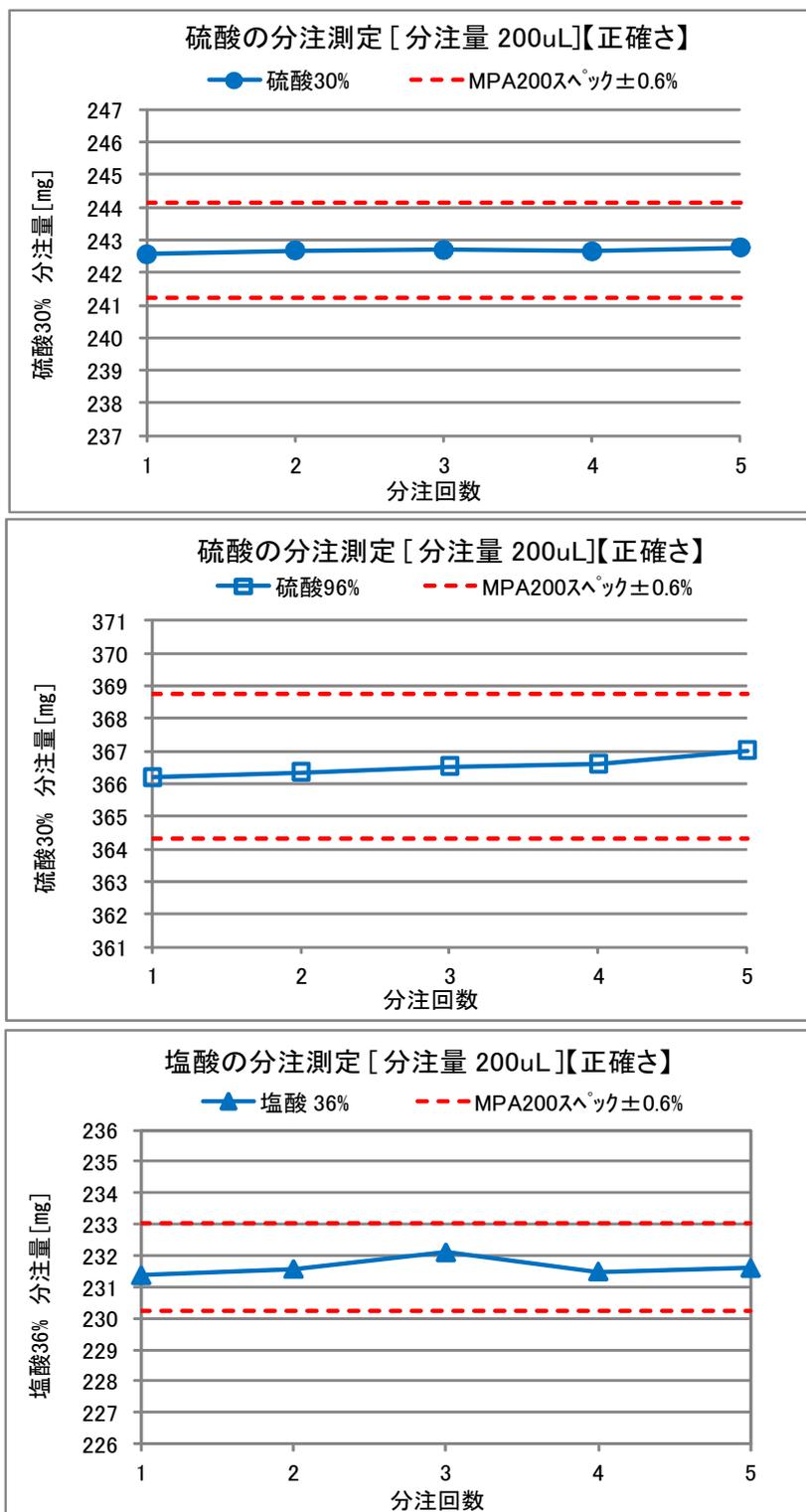
3-2 酸性液体の分注結果

[グラフ 10] は酸性液の分注量を測定した結果です。

粘度の高い硫酸 96%は、吸引/排出の速度を低速 (MPA-200 速度 1) に設定し、揮発性の高い塩酸 36%は分注を行う前に十分なプレリンスを行いました。

分注量にバラツキは無く、一定量の分注が可能であることを確認しました。

[グラフ 10] MPA-200 で 200uL 分注



4. チップの互換性

4-1 チップ内フィルターの有り／無しによる分注量の差

フィルター付きチップと、フィルター無しチップで分注量に差があるか、確認した結果を [グラフ 12] に示します。

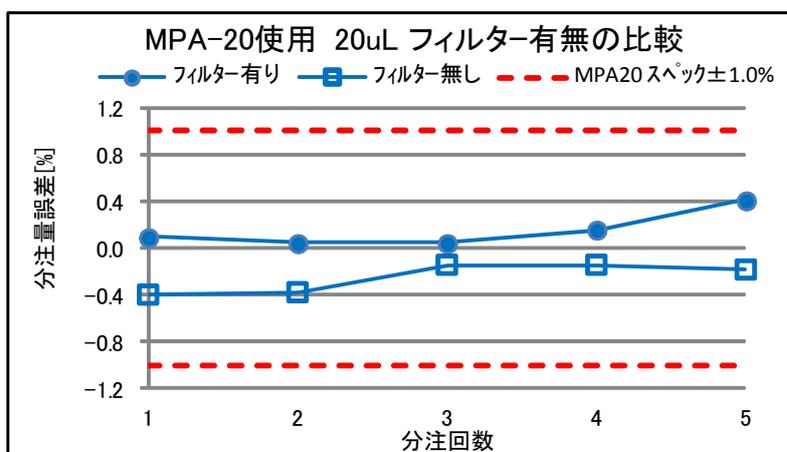
結果としては、フィルターの有り無しで分注量に差はありません。

ピペットによる液体の吸引・排出は、ピストンと液体間の空気を介して行われます。

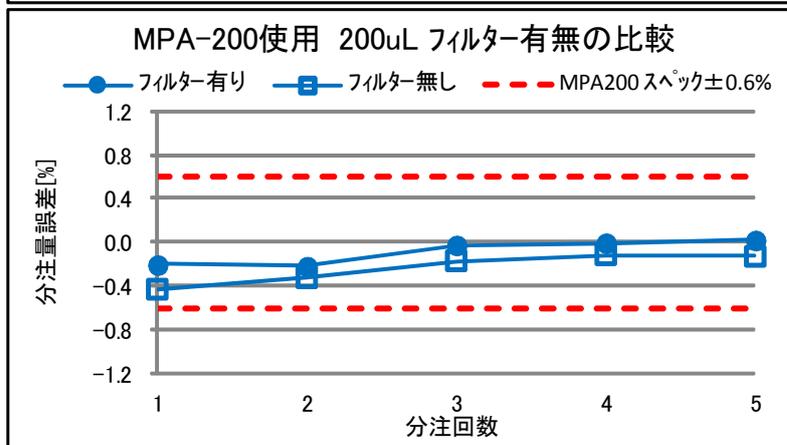
液体がチップ先端の細い穴を通過する際に発生する抵抗に比べ、空気(水の 1/50 程度の粘度)がチップ内のフィルターを通過するとき抵抗が非常に小さいと判断されます。

[グラフ 12]

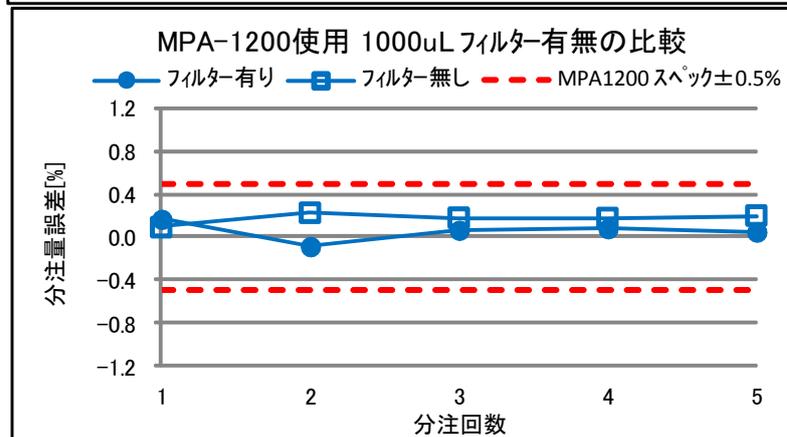
MPA-20 で
20uL 分注



MPA-200 で
200uL 分注



MPA-1200 で
1000uL 分注



4-2 MPA と各種チップの適合

各種チップに関し、MPA との適合を確認して結果を次に示します。

MPAチップ適合表

2018/1/25

ピペット	チップメーカー	チップ型番	適合性	備考
MPA-10/20	Gilson	D10	○	
		DL10	×	装着不可
	Eppendorf	epT.I.P.S.スタンダード [®] 10uL用 (0030 000.811)	○	
	Rainin	RC-10 / RCC-10	○	
	Biohit	Optifit Tips 0.1-10ul用	○	
	Thermo	Finntip Flex 10	○	
	BRAND	Pipette Tips 0.1-20ul用	○	
	ニチリョー	00-BMT-SS	○	
	QSP	101	○	
		114	×	装着不可
	ワトソン	207C	○	
	日本ジェネティクス	37660	○	
		10310	○	
Labcon	1038	○		
MPA-200	Gilson	D200	○	
	Eppendorf	epT.I.P.S.スタンダード [®] 200uL用 (0030 000.889)	○	
	Rainin	RC-250 / RCC-250	○	
	Biohit	Optifit Tips 0.5-200ul用	○	
	Thermo	Finntip Flex 200	○	
	BRAND	Pipette Tips 2-200ul用	○	
	ニチリョー	00-BMT-SE	○	(チップイジェクタの高さ調整が必要)
	QSP	110-NEW	○	
		110-N	○	
		110-B	○	
	ワトソン	705Y	○	
	日本ジェネティクス	FG-301RS	○	
		FG-302	○	
		10340	○	
	Labcon	1093	○	
MPA-1200	Gilson	D1000	△	1200uLの吸引ではチップホルダーに接液 1000uLの吸引であれば使用可能
	Eppendorf	epT.I.P.S.スタンダード [®] 1000uL用 (0030 000.927)	○	
	Rainin	RC-1000 / RCC-1000	○	
	Biohit	Optifit Tips 10-1000ul用	○	
	Thermo	Finntip Flex 1000	○	
	BRAND	Pipette Tips 50-1000ul用	○	
	ニチリョー	00-BMT-L	○	
	QSP	111	○	
	ワトソン	706B	○	
	日本ジェネティクス	34760	○	
	Labcon	1045	○	
Greiner Bio-One	750251	○		
MPA-10000	Gilson	D10mL	○	※1
	Eppendorf	epT.I.P.S.スタンダード [®] 10mL用 (0030 000.765)	○	
	Rainin	RC-10ML	○	※1
	Thermo	Finntip 10mL	×	装着不可
	BRAND	Pipette Tips 1-10ml用	○	※1
	ニチリョー	00-BMT2-Z	×	装着不可
	QSP	097	○	※1
	ワトソン	409C	○	※1
	Axygen	T-10ML-C	○	※1

※1 チップは手で外す必要あり

適合性

○ : 適合	チップ装着、イジェクト問題、吸引・排出で問題なし 精度については、A&D標準チップとの比較で±1.5%以内(最大容量にて)であることを確認 (MPAの容量校正機能により、より精度を高めることも可能)
△ : 注意	使用する容量に制限あり
× : 不適合	装着不可ほか

※適合性は、弊社にて確認した結果であり、将来的に保証するものではありません。適合表を参考に、お手持ちのチップにてご確認願います。

5. 測定データの付録

5-1 醤油の分注

種類が違う醤油を5種類、試液として使用し、分注量の比較測定を行いました。

精製水と比較すると、醤油は粘度が高い為、ピペットの設定をリバースモードにし、吸引・排出速度は最遅（速度1）にしました。

[グラフ 11] は精製水と醤油5種類の1000uL分注を10回連続で行い、グラフで示した結果です。

試液A・B・Cは1回目の分注量が多く、分注を繰り返す毎に、徐々に減少して規定値に近づきます。

この理由として

- ・設定をリバースモードにしたことにより、チップ内に多めに液体が存在しています。
- ・プレリンスを行っていないため、1回目の吸引後、液体からの揮発が影響して排出時にピストンの移動量よりも多くの液体が排出されます。
- ・分注を繰り返すことによりプレリンスの効果となり、液体の揮発が押さえられ、一定値に落ち着きます。

試液D・Eは1回目の分注量が少なく、2回目の分注量が最大となり、分注を繰り返す毎に、徐々に減少して規定値に近づきます。

この理由として

- ・液体の粘性が高く、液体がチップ内壁に付く量が多くなります。このため、1回目の分注の排出では液体が排出される前に空気が排出され、分注量は少なくなります。
- ・2回目以降の分注では、既にチップ内壁に液体が付着しているため、液体よりも先に空気が押し出されることはなくなります。
- ・試液A・B・Cと同様に、分注を繰り返すことによりプレリンスの効果となり、液体の揮発が押さえられ、一定値に落ち着きます。

	精製水	試液 A	試液 B	試液 C	試液 D	試液 E
粘度値 [mPa・s]	0.94	2.66	2.59	2.37	17.0	16.0
密度 [g/cm ³]	0.9968	1.1644	1.1686	1.1082	1.2705	1.2258

[グラフ 11] MPA-1200 で 1000uL を分注

