

第 82 回 日本分析化学会有機微量分析研究懇談会

第 98 回 計測自動制御学会力学量計測部会

合同シンポジウム(第 32 回 発表資料)

テーマ：マイクロピペットを利用した分注操作について

(英題：Usage of the micropipette)

発表者：(株) エー・アンド・デイ 第 1 設計開発本部
出雲直人、深見雄二、有賀千佳

主催：日本分析化学会有機微量分析研究懇談会

共催：S I C E (社) 計測自動制御学会力学量計測部門

後援：愛媛大学

協賛：日本分析化学会・日本化学会・日本薬学会

会期：2015年5月28日(木)、29日(金)

会場：愛媛大学 南加記念ホール・校友会館

マイクロピペットを利用した分注操作について

— 高粘度液体、溶剤、強酸性液体の安定した分注 —

(株)エー・アンド・デイ 設計開発本部 第5部 出雲直人、○深見雄二、有賀千佳

キーワード：ISO8655、グリセロール、アセトン、MEK、硫酸、塩酸、リバースモード、プレリンス

1. はじめに

マイクロピペットの性能確認や機器管理には精製水が利用されています。しかし、ピペットの使用現場では、粘度が水とは異なる溶媒や、溶剤など揮発性ある液体、強酸など活性の高い液体が分注されることが少なくありません。

本報告は、①粘度が高い、②揮発性がある、③強い酸性を示す液体、④ピペットの溶剤と酸への耐性について、マイクロピペットを使用して正確に分注する為の操作方法の確認を行い、その結果をまとめたものとなります。

2. 実験方法

ピペットの機器としての性能は、『正確さ』と『再現性』*1で評価されます。本報告はピペットの操作方法と溶液の特性に対する検証実験となる為、その前提となる被試験ピペットには、機器としての高性能が要求されます。そこで、測定には電動シングルピペットを利用しました。電動ピペットは、パルスモータによるデジタル制御が行われており、人為による分注性能の差が最低限に抑えられる機器となっています。精度確認実験には、ISO8655*2で規定される重量法を利用した容量確定を行いました。また実験には、比較的利用頻度が高く、操作による影響が出にくい機器として容量200 μ Lの電動ピペット*3を使用しました。

3. 実験結果

3-1) 粘度の高い液体の分注 (グリセロールの分注)

グリセロールは酵素の保管などで多用される媒体となります。原液では粘度が大変高く、粘度の基準となる水の約800倍程度(800mPa \cdot s)*4の粘度値となります。この為、原液のままでの分注は不可能ですが、グリセロール80%濃度の水溶液にすると粘度が49mPa \cdot sと急激に低下し、分注が可能となります。一般的な使用条件及び、最も難しい分注条件として、濃度80%となるグリセロールの分注について測定した結果がFig.1,2となります。

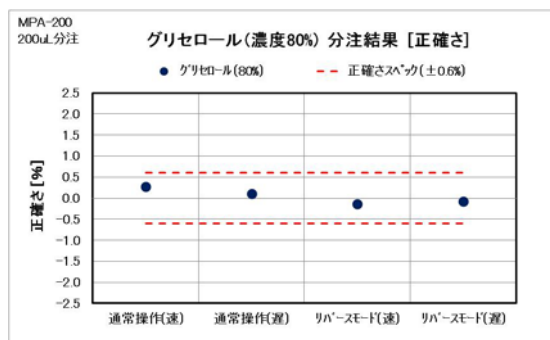


Fig. 1 グリセロールの分注結果：正確さ

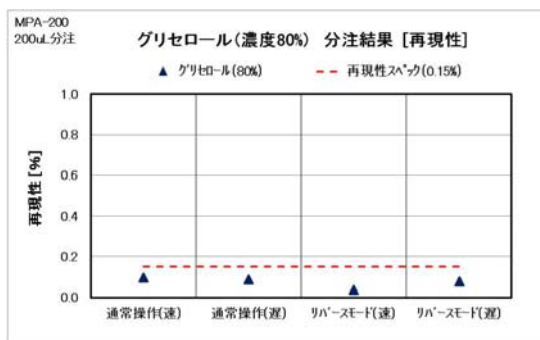


Fig. 2 グリセロールの分注結果：再現性

グリセロール 80%溶液は、その高い粘度値に関わらず、正確な分注が可能です。200 μ Lにおける正確さ、再現性ともに ISO8655 に規定された $\pm 0.8\%$ 、 0.3% 以下の分注が可能となる結果が得られました。この分注精度を確保するには、通常のピペット操作の注意点を守り、チップ内壁へのグリセロールの残留による影響を受けない、リバースモード*5での操作が必要となります。

また、Fig.3,4 は代表的な増粘剤となる HPC(ヒドロキシプロピルセルロース)の分注結果となります。いずれもリバースモードを利用し、試料をゆっくり吸引・排出する事で正確で安定した分注の出来ることが理解されます。

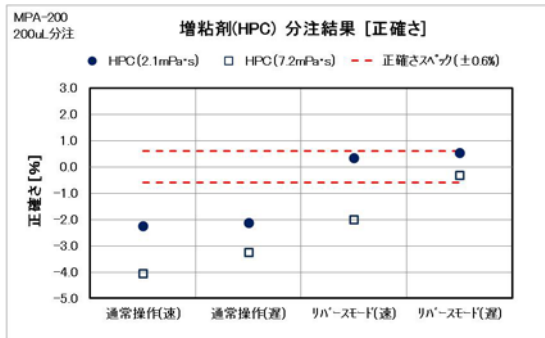


Fig. 3 増粘剤(HPC)分注結果：正確さ

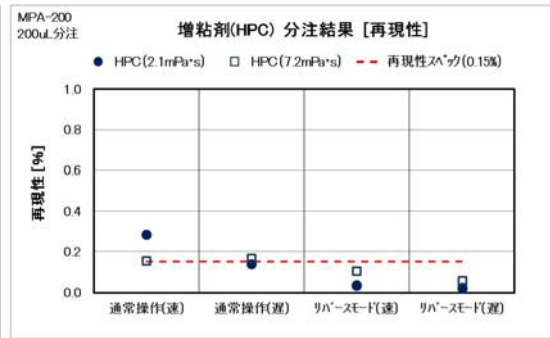


Fig. 4 増粘剤(HPC)分注結果：再現性

3-2) 有機溶剤の分注 (アセトン、MEK)

代表的な有機溶剤となるアセトンと MEK について分注を行った結果を Fig.3 にまとめました。グラフからは数回の分注後に容量の安定が見られます。有機溶剤はチップからの液漏れが発生し易く、正確な分注が困難と考えられています。この理由は有機溶剤の揮発性に原因があり、溶剤の蒸気でピペットのシリンダ内圧が変化し、また蒸発による気化熱によりシリンダ内の温度が変化する為と考えられます。これらの現象が、Fig.5 にて初回分注量が減少し、その後は増加し徐々に減少し、その後、設定値に収束する現象になると思われれます。アセトンの分注精度が安定するのにより長時間を必要とするのは、アセトンの揮発が激しく、シリンダ内圧の安定に、アセトンの揮発性により発生する気化熱の影響が表れていると判断されます。

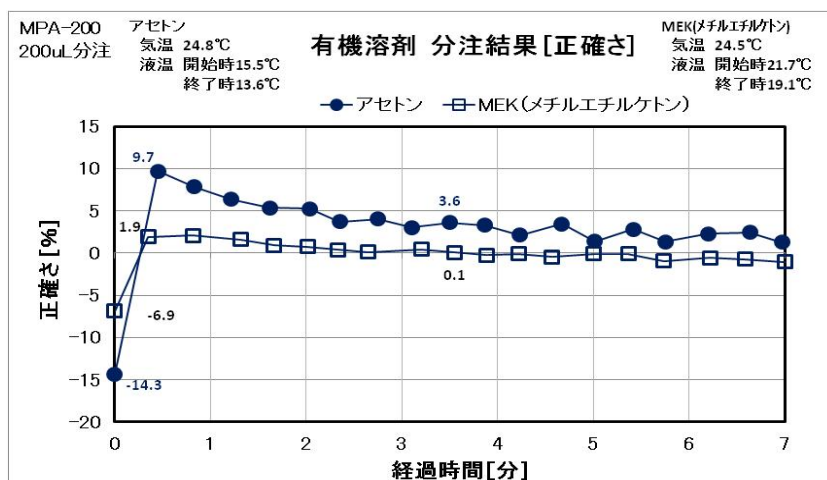


Fig. 5 有機溶剤の分注結果

3-3) 強酸性液体の分注 (硫酸、塩酸)

硫酸濃度 36%、96%、塩酸濃度 36%の3種類の分注精度を Fig.6,7 にまとめました。これらの液体は、粘度が高く揮発性があります。この為、吸引・排出測度を遅くし、かつ事前にプレリンス*6 を行い分注することで、安定した排出容量の確定が可能であることが理解されます。

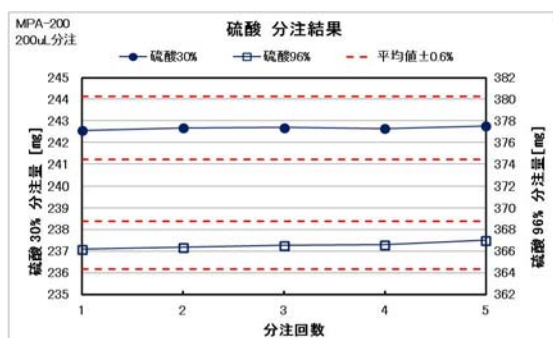


Fig. 6 硫酸の分注結果

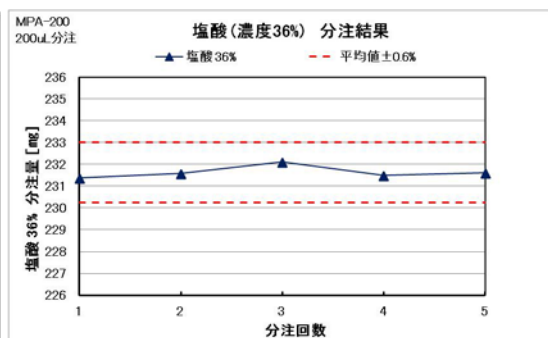


Fig. 7 塩酸の分注結果

3-4) 溶剤、強酸への耐性 (アセトン、硫酸)

アセトン及び濃度 96%となる硫酸原液を、それぞれをチップに 200 μL 吸引し 6 日間放置し、その前後で、純水を利用した精度確認結果を Fig.8,9 にまとめました。グラフは、溶液吸引前後の容量について『正確さ』を表したものとなります。それぞれの結果は、ISO8655 の規格±0.8%に入り、アセトン、硫酸を 6 日間チップに吸引放置したことによる、正確さに対する影響の無いことを示しています。

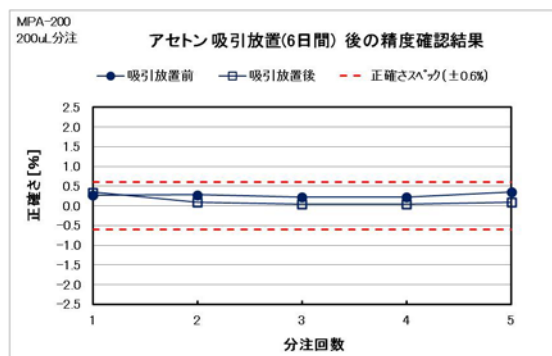


Fig. 8 アセトン吸引後の精度確認結果

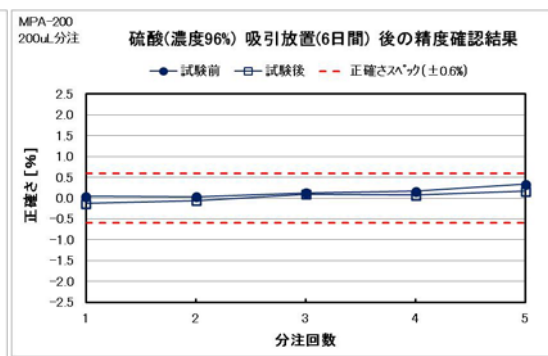


Fig. 9 硫酸吸引後の精度確認結果

4. 考察及び今後の課題

マイクロピペットは、使用される業界や業種、また被測定溶液の多様さにおいて、他に比較できる機器がないと言えるほど、広範囲に使われています。また、製薬や生命工学を筆頭とした研究分野、臨床試験、環境を含む材料分析、新素材の開発分野で必要不可欠な機器として使われており、現在では全世界で年間 150 万台程度の市場に成長していると推察されます。しかし、その使用方法や操作に関するノウハウについて、公では全く議論されていない機器となっています。そこで、今回、マイクロピペットの使用者が不安に思っている代表的な液体について、実際の分注を行い、結果についてまとめました。その結果は、正しい操作を行えば、正確な容量確定が可能であ

る事を示すものとなりました。今後は、上記溶液に対するピペットの経時での耐性確認などを行い、より使い易く、また高精度の確保されるピペットの開発を目指したいと考えます。

参考文献、用語説明

- *1 正確さ：設定容量に対する分注量のずれ、再現性：同一容量を繰り返し分注したときのばらつき。ISO8655-6 Systematic error、Random error
- *2 ISO 8655:2002 Piston-operated volumetric apparatus
- *3 (株)エー・アント・テイ製 電動マイクロピペット MPA-200 (容量範囲 10~200uL)
<http://www.aandd.co.jp/adhome/products/analytical/mpa.html>
- *4 出雲直人、他 2 名(株)エー・アント・テイ 『音叉振動式レオメータ：レオビスコ RV-10000 の特長』第 29 回センシングフォーラム(計測自動制御学会)、2012.9
- *5 *6 リバースモード：設定容量よりも多く吸引し、規定量を排出する方法
プレリンス：分注前に、吸引・排出を繰り返し行う作業
(株)エー・アント・テイ 『ピペット操作ガイド』
http://www.aandd.co.jp/adhome/pdf/tech_doc/analytical/pipette_guide_rev1.pdf

Usage of the micro-pipette

Naoto IZUMO, ○Yuji FUKAMI, Chika ARIGA A&D Company Limited

ABSTRACT

We report the suggestion for when dispensing the high viscosity solution such as glycerol, volatile organic solvents or strong acid solution, with the dispensing accuracy data.

Keywords

ISO8655, Glycerol, Acetone, MEK, Sulfuric acid, Hydrochloric acid, Reverse operation mode, Pre-rinse