

キャピラリーイオンクロマトグラフィーによる 超純水中の微量陰イオンの定量

日本ダイオネクス株式会社

キーワード

キャピラリーイオンクロマトグラフィー、微量分析、電力産業、電子産業、Dionex ICS-5000+

はじめに

超純水中の微量陰イオンの定量は、電力・電子産業にとって重要です。イオンによる汚染が $\text{ng/L} \sim \mu\text{g/L}$ 濃度レベルで起きると、大切なプロセス機器が腐食して、事故や予定外の高額な維持費が発生する可能性があります。また、電子産業におけるイオンの汚染は、半導体やディスクドライブコンポーネントの初期不良や歩留り低下の原因になります。

微量イオンの定量については、今までにもアプリケーションノートでいくつかの手法を紹介してきました。本稿ではキャピラリースケールのカラムを用いるイオンクロマトグラフィーにより、微量分析において優れた結果が得られたので報告します。

キャピラリーイオンクロマトグラフィー (キャピラリーIC) の特長

- ・キャピラリーICでは、内径が0.4 mm のカラムによって、 $10 \sim 30 \mu\text{L/分}$ の流量でイオンが分離されるため、溶離液消費量および排水量をわずか5 L/年程度に削減可能です。流量の低減により、質量感度が向上するという利点もあり、キャピラリーICでは、より少ない試料量（マイクロボアシステムやスタンダードボアシステムで使用する量の25分の1から100分の1の量）の試料で、同じピーク感度を得ることができます。
- ・Thermo Scientific™ Dionex™ AS-AP オートサンプラーは、キャピラリーICに最適なオートサンプラーです。試料の量が限られている場合に微量注入することもできますが、10 mLのバイアルから濃縮カラムに直接試料を注入することができます。このため、システムのコストと複雑さが軽減されるとともに、汚染源が排除されます。 ng/L の低い濃度レベルのイオンを定量する場合、試料の注入には、含気性試料用の送液アクセサリーを使用する必要があります。
- ・ICW-3000では、超純水がキャピラリーICシステムに直接供給されるため、汚染リスクの多くが排除され、一貫してブランクレベルを低く保つのに役立ちます。

質量感度の向上は、微量成分分析にとって理想としますが、一方で、実験室環境からの汚染を防ぐという新たな課題が発生します。キャピラリーICを用いて微量分析をおこなうポイントについても、本稿でご紹介します。

装置

Thermo Scientific Dionex ICS-5000+ システムには、以下のものが含まれます。

- ・ポンプモジュール (DP/SP、キャピラリー用)
- ・溶離液ジェネレーターモジュール (EG)
 - 陰イオン用のキャピラリー EGC カートリッジ EGC-KOH
 - 陰イオン用のキャピラリートラップカラム CR-ATC
- ・検出器/クロマトグラフィーモジュール (DC)
 - キャピラリー 電気伝導度検出器 (CD)
 - ICキューブ キャピラリーモジュール
 - ・脱気カートリッジ
 - ・キャピラリーカラムトレイ
 - ・陰イオン用のキャピラリー電解サブレッサー ACES 300
 - ・陰イオン用の炭酸除去デバイス CRD 200
 - 6ポート高圧バルブ
- ・濃縮カラム Thermo Scientific Dionex IonSwift MAC-100
- ・Dionex AS-AP オートサンプラー ICW-3000 インライン超純水製造装置
- ・溶離液の調製およびオートサンプラーの洗浄に使用する超純水を供給します。

(ダイオネクスの製品はすべて、Thermo Scientific の商標のもとに販売されています。)

- ・ Thermo Scientific Dionex Chromeleonクロマトグラフィーデータシステム (CDS)
- ・ Thermo Scientific Dionexバイアルキット、10 mL ポリスチレン製: キャップと青色のセプタムが付属、微量成分分析の場合はPTFE製セプタムを使用
- ・ 低濃度標準液および試料用の Corning® 未処理ポリスチレン製培養フラスコ
- ・ クラス5クリーンルーム用ニトリル製手袋 Ansell Nitrilite®
- ・ クリーンルーム用ポリエステル製ワイブ Berkshire120
- ・ バイアルやキャップ、セプタム、ピペットチップ、コネクターを浸漬するための容器 Nalgene® フィルターフラスコ

試薬

各陰イオンについて1000 mg/L標準液、または陰イオン混合標準液を準備してください。これらの標準液は濃度が保証されたものを使用してください。

微量分析のための準備

微量イオンを定量する場合、測定妨げになる汚染源は多数あります。微量成分分析環境で作業するには、普段の分析以上に気を配る、一貫した作業手順でおこなう、分析環境や使用器具からの汚染リスクを考慮することが必要です。このセクションでは、クリーンな水の重要性や、隔離されたクリーンで粒子の少ない作業環境、実験用手袋の選択と着用、作業者の身だしなみと分析時の態度、そして微量成分分析を行う作業エリアに適した用具について、説明します。

1. 水: 微量イオンの定量には、生成されたばかりの 18.2 MΩ-cm の超純水を採水口から直接採取することが不可欠です。また超純水製造装置を適切に使用することも重要です。
 - a. 水の抵抗率が表示され、再循環式で採水口が接続された、超純水製造装置のみを使用します。
 - b. 超純水は採水口から必ず1分以上流し、抵抗率が 18.2 MΩ-cmと表示されてから使用します。
 - c. 標準液や試料溶液を調製するために採水するときは、超純水は流したままにしておきます。
 - d. ICW-3000インライン超純水製造装置を用いると、溶離液ポンプ、オートサンプラーの洗浄配管に、超純水を直接供給することができます。これによって、環境、溶離液ボトル、およびオートサンプラーの洗浄水ボトルからの汚染を排除できます。(装置の設置については、「装置の準備」のセクションで説明します。)

2. 作業環境: 空気中の浮遊粒子によって、微量成分分析作業エリアが汚染される可能性があります。浮遊粒子による汚染を最小限に抑えるには、
 - a. 暖房器具、冷房装置、機器の通気孔、化学物質の保管や秤量エリアからも離れた、人の往来の少ないエリアに機器を設置します。
 - b. クリーンルーム用ワイブと新鮮な超純水で、すべての表面をきれいに拭きます。
 - c. この作業エリアの近くで集団で話をするとは、避けます。人はイオン性汚染物質のエアロゾルや塵粒を巻き上げたり発生させたりする可能性があります。
 - d. 可能であれば、クリーンフードやクラス10のクリーンルームを使用します。

3. 手袋: 手袋は、試料、ブランク、標準液への重要な汚染源になる可能性があります。手袋使用時の注意点を以下に挙げます。
 - a. パウダーフリーでクラス10またはクラス100の、ニトリル製無着色クリーンルーム用手袋を使用します。
 - b. 手袋を着用するときは、手袋の袖以外の部分を持たないようにします。手袋の先端には絶対に素手で触らないでください。
 - c. 手袋のサイズは、ぴったりしているが、窮屈ではないものを選択します。指先が数ミリ以上余る手袋は使用しないでください。必要以上に大きい手袋を着用すると、試料容器の汚染が起こりやすくなります。
 - d. 微量成分分析の作業エリアでは、必ず手袋を着用します。
 - e. 顔や髪、不必要な物に触れた手袋は廃棄します。特に高濃度標準液や固体試薬、紙製品などに触れた手袋は必ず廃棄してください。
 - f. 試料や標準物質の容器を扱うときは、絶対に容器の首や蓋に触れないようにします。
 - g. 手袋が水に触れたり、浸漬中の容器、試料溶液、標準液の中に手袋からの水がしたり落ちたり、はねて入ったりしないようにしてください。

4. パーソナルケア製品: 制汗剤・パウダー・ヘアケア製品・化粧品・香水・ローションなどのパーソナルケア製品が汚染源になることがあります。
 - a. 汚染源になるため、これらの製品の使用は、クラス100以上のクリーンルーム環境では認められていません。
 - b. クリーンルーム以外の環境では、これらの製品は汚染源として考慮する必要があります。とくに微量成分分析法を検討時は、汚染源の排除に時間を費やさないように、分析担当者はパーソナルケア製品の使用を最小限にする必要があります。

- c. 会話・くしゃみ・笑い・咳は、ナトリウム・アンモニウム・カリウム・塩化物・硫酸・有機酸などが高濃度に含まれた粒子のミストを発生させます。コップ1杯の水に塩の粒子が1個含まれている場合は、約20 mg/L の塩化物に相当します。
- 1) 試料を調製しているときや、器具をゆすいでいるときは、顔や髪の毛、皮膚に触れないようにします。
 - 2) 試料や標準液を調製するときは、クリーンルーム用マスクを着用します。
 - 3) くしゃみや咳がかかった溶液や容器は微量用として使いません。
 - 4) 勤務時間中に、塩分の高い食品（スナック菓子やソースなど）を摂取することや取り扱うことは控えます。これらの食品の塩分濃度は、一般に g/L レベルです。
 - 5) 微量成分分析エリアでのミーティングや会話は、環境からの汚染、とくにアンモニウム・有機酸・ナトリウム・カリウム・塩化物による汚染が増加する可能性があるため避けるようにします。
3. 用具: 他の分析との共用は絶対にしないでください。汚染を避けるため、微量成分分析エリアで使用する用具は別になります。
- a. セルロース製品: 実験室用ワイブ・秤量紙・綿棒など、どのようなタイプのセルロース製品にも、塩化物や硫酸が高濃度で含まれているため、セルロース製品は重要な汚染源になります。
- 1) 粒子やイオン性汚染物質の少ないポリエステル製ワイブ（クリーンルーム用ワイブなど）を使用します。
- b. 粘着テープ・ガムテープ・ラベル・マーカー: 裏面粘着式の紙やビニールラベルには、塩化物や硫酸が高濃度で含まれています。
- 1) 裏面粘着式の紙またはビニール製のラベルやテープの使用は避けます。
 - 2) 試料の標識付けには、クリーンルーム用の粘着テープやラベルを使用するか、マーカーペンを使用します。
- c. プラスチックとゴム製品:
- 1) 標準物質や試料に関連した物を取り扱うときは、プラスチック製の秤量皿を使用しないでください。秤量するときは、最終容器の風袋を計量してから、標準物質や試料を最終容器に直接、秤り取ります。
 - 2) 容器はポリスチレン製または FEP®(フッ化エチレンプロピレン) 製のみ、バイアルはポリスチレン製のみを使用します。
 - 3) オートサンプラーバイアルのセプタムは、汚染物質が含まれていないことが検証済みである青色のセプタムまたは PTFE 製セプタムのみを使用します。
- d. ピペット: ピペットおよびピペットチップは、微量成分分析に適していないものがほとんどです。
- 1) ピペットチップは、高濃度標準液（中間標準液など）を調製する場合にのみ使用し、低濃度溶液を扱う作業では使用しないでください。ピペットチップは、汚染のないことが検証済みのもの（チップケースに入ったピペットチップなど）以外は使用しないでください。
 - 2) ピペットチップは、使用する前に、汚染物質除去処理済みポリスチレン製フラスコ内で新鮮な超純水に浸漬します。また、クリーン度をさらに確保するため、ピペットチップの取り扱いに使用するピンセットは、SS416 ステンレス鋼製以外のものは使用しないようにします。
- e. ガラス: ガラス製容器は、イオンの定量には適していません。
- f. ピンセット: ピンセットは、セプタムを取り扱う際に不可欠な用具です。
- 1) バイアルのセプタムの取り扱いには SS416 製ピンセットを使用します。
 - 2) 微量成分分析エリアで使用するピンセットは別に用意します。
 - 3) セプタムには絶対に素手や手袋が触れないようにしてください。シンクや床に落ちたセプタムはすべて廃棄します。
 - 4) ピンセットは必ずゆすいでから使用し、先端は絶対に実験台や他の汚染された表面に触れないようにしてください。
- g. 洗浄瓶: 洗浄瓶は潜在的な汚染源であると考えられるため、微量イオン分析で使用することはお勧めできません。mg/L という高い濃度レベルの汚染物質が、洗浄瓶から検出されたという報告があります。洗浄瓶を使用する場合は、以下のことを厳守してください。
- 1) 他の人が使用した洗浄瓶は使用しない。
 - 2) 標準液や試料溶液のメスアップに洗浄瓶を使用しない。
 - 3) 使用する洗浄瓶は FEP 製のものにする。
 - a. 微量成分分析用の FEP 製洗浄瓶は別にしておきます。
 - b. 洗浄瓶は新鮮な超純水で使用前または 1 日に 1 回以上ゆすいでから、超純水を満たします。
- h. 試薬および高濃度標準液: 少量の試薬や高濃度標準液によって、水ブランク、システム、試料が簡単に汚染されてしまう可能性があります。
- 1) 相互汚染を避けるため、微量濃度の物質が入った容器は高濃度の物質が入った容器から離して保管します。
 - 2) 試薬、高濃度標準液、化学天秤には近づけないようにします。
- i. 石けんおよび洗剤: 石けんや洗剤には一般にナトリウム・硫酸・カルシウムが高濃度に含まれています。また、石けんや洗剤は水よりも表面張力が小さいため、除去することが困難です。
- 1) IC システムに注入するもの（試料・標準物質など）を入れる容器には、石けんや洗剤を絶対に使用しないでください。

標準液と試料溶液の調製

微量イオンを定量する上で極めて重要なことは、試料や標準物質の容器の汚染を可能な限り小さくすることです。このセクションでは、微量成分分析法の開始段階やトラブルシューティングで役立つ内容について説明します。ここでは、一般的な操作のうち、容器の準備や標準液の調製、試料採取について説明します。

容器の準備

微量成分分析用の試料と標準物質の調製には、イオンの溶出が少ない容器と特別な取り扱いが必要です。未処理ポリスチレン製培養フラスコとFEP製容器は、イオンによる汚染が小さく、微量成分分析に適した容器です。未処理ポリスチレン製培養フラスコなどが、試料溶液と標準液の保存容器として推奨されます。容器のキャップに付いているライナーやフィルターには、通常、塩化物と硫酸が mg/L 濃度レベルで含まれているため、このようなキャップは絶対に使用しないでください。粒子含有量の低いFEP製容器も、微量成分分析に適しています。

汚染源を除去したフラスコを準備するには、18.2 MΩ-cm の超純水の蛇口を開けたまま、フラスコを18.2 MΩ-cm の超純水で5回ゆすいだ後、最上部まで満たします。あらかじめ5回ゆすいでおいたキャップで栓をして（このとき、できる限り空気を追い出します）、一晚浸漬します。このゆすぎと浸漬の処理を3日以上、毎日繰り返します。容器の標識付けにはマーカーペンを使用します。マーカーペンもイオンによる汚染が起こる可能性があります、この汚染は裏面粘着式の紙やビニールラベルを使用した場合よりもかなり小さいと考えられます。

標準原液

濃度が保証されたIC標準原液のみを使用することで、汚染を最小限に抑えることができます。

100 μg/L 陰イオン混合標準液の調製（中間液）

100 μg/L 陰イオン混合標準液（中間液）を調製するときは、この溶液の調製が済むまで、超純水製造装置の蛇口を開けたままにします。汚染源除去処理済みフラスコの場合と同じゆすぎの手順で、超純水で5回ゆすぎます。余分な水を振り切ってから、上皿式はかりでフラスコの風袋を計量します。約250 ± 1 g の超純水を、超純水の蛇口からフラスコに直接充填します。フラスコ内の水量が249 g より少なかった場合は、すぐにフラスコの口を蛇口の下に持って行き、水を足します。フラスコ内の水量が251 g より多かった場合は、余分な水をシンクにそっと振り落とし、超純水製造装置の蛇口を閉めて、水の重量を記録します。使い捨てピペットチップが付いたピペットで、1000 mg/L の濃度認証済みのフッ化物・塩化物・亜硝酸・硫酸・臭化物・硝酸の各標準原液から 25 μL ずつ取って、フラスコに移します。

最終重量を記録し、栓をして静かに混和します。標準原液の量と総重量から、実際の濃度を計算します。各陰イオンの濃度は、約100 μg/L です。このフラスコは低濃度の試料溶液や標準液を汚染させる可能性があるため、この標準液専用にします。そのため、このフラスコは、汚染物質除去処理を再度行った上で、検査によってクリーン（イオン性汚染物質の濃度が10 ng/L）であることが証明されない限り、試料溶液や検量用標準液の保存には、絶対に使用してはいけません。

検量用標準液の調製

検量用標準液、たとえば1 μg/L の濃度の陰イオン混合標準液を調製するときは、その標準液の調製が終了するまで超純水製造装置の蛇口を開け、流したままにします。汚染物質除去処理済みフラスコを5回ゆすぎ、余分な水を振り切ってから、上皿式はかりでフラスコの風袋を計量します。約246.5 ± 1 g の超純水を、超純水製造装置の蛇口からフラスコに直接充填します。超純水を別の容器に取ってフラスコに移すと、新たな汚染が起こる可能性があるため行わないでください。フラスコ内の水量が 245 g より少なかった場合は、すぐにフラスコの口を蛇口の下に持って行き、水を足します。フラスコ内の水量が 247 g より多かった場合は、余分な水をシンクにそっと振り落とし、超純水製造装置の蛇口を閉めて、水の重量を記録します。フラスコに陰イオンの中間混合標準液（100 μg/L）約2.5 ± 0.5 g を慎重かつ丁寧に注ぎ込みます。実際の重量を記録し、栓をして静かに混和し、濃度を計算し直します。同様にして汚染物質除去処理済みフラスコに超純水 225 ± 1 g を充填し、1 μg/L の濃度の標準液を約25 ± 0.5 g 注ぎ込み、100 ng/L の濃度の検量用標準液を調製します。

試料の採取

試料を採取する手順は、一般には業界ごとに規定されています。ただし、微量成分分析を必要とする業界ではいずれも汚染のないクリーンな容器に試料を確実に採取するための一般的な注意点は同じです。以下に、いくつかのポイントを簡単に説明します。

1. 「容器の準備」のセクションで述べたように検査によってクリーンであることが証明された汚染物質除去処理済み容器に試料を採取します。
2. 他の試料からの汚染を避けるため、可能であれば、試料を採取する前に試料ポートから目的の試料を1分間流しておきます。試料ポートの先端部分には、試料由来の沈殿物が残っている可能性もあります。
3. 試料が環境から汚染されるのを最小限に抑えるため、試料採取は試料ポートに触れないようにしてできる限り試料ポートの近くで行います。
4. 採取したら、フィルターとライナーが付いていない汚染物質除去処理済みキャップですぐに容器に栓をします。
5. 容器への標識付けはマーカーペンで行うことを推奨します。

装置の準備

キャピラリー IC システムと Dionex AS-APオートサンプラーで使用するチューブは、カットされたものを購入して使用します。

コネクターとフェラル

コネクターやフェラルからの汚染を最小限に抑えるため、これらの部品は新しいもののみを使用し、18.2 MΩ-cmの新鮮な超純水の入った汚染物質除去処理済みポリスチレン製容器中で浸漬します。

ICW-3000インライン超純水製造装置

ICW-3000インライン超純水製造装置は、微量イオンの定量に必要な装置であり、分析する濃度レベルが ng/L の場合には、とくに必要になります。ICW-3000インライン超純水製造装置の設置手順:

- 1.ICW-3000の設置マニュアル³に従って、同装置を接続します。
- 2.図1に従って、IC本体およびオートサンプラーと接続します。溶離液ポンプに接続するフィッティングとオートサンプラーのシリンジを、図2と図3に示すように組み立てます。
- 3.さらにマニュアルに従って装置内の水を循環させます。
- 4.IC本体、ICW-3000およびChromeleonソフトウェアの設置マニュアルに従って、配管とソフトウェア制御を設定します。
- 5.ICW-3000超純水製造装置のタンクの水は、微生物による汚染を最小限に抑えるため、新鮮な超純水に定期的に入れ替えます。

Dionex AS-APオートサンプラー

正しい測定結果を得るためには、流路に気泡が混入していないことが重要です。ICW-3000インライン超純水製造装置から超純水を送液し、シリンジとサンプリングニードルへの流路、およびディバーターバルブとインジェクションバルブへの流路をフラッシュします。Dionex AS-AP操作マニュアル³に従って、オートサンプラーニードルを試料トレイ、オートサンプラー注入ポートおよびオートサンプラー洗浄ポートの位置と合わせ、サンプリングニードルから注入ポートにおける試料の送液ライン量 (TLV) を校正します。

Dionex AS-APオートサンプラーには、微量成分分析用試料の注入に役立つ機能が多数搭載されています。ただし、アクセサリーによって同システムが汚染することのないように、いくつか手順を追加する必要があります。以下に、直接大容量ループ注入と濃縮による大容量注入の両方の設定について説明します。

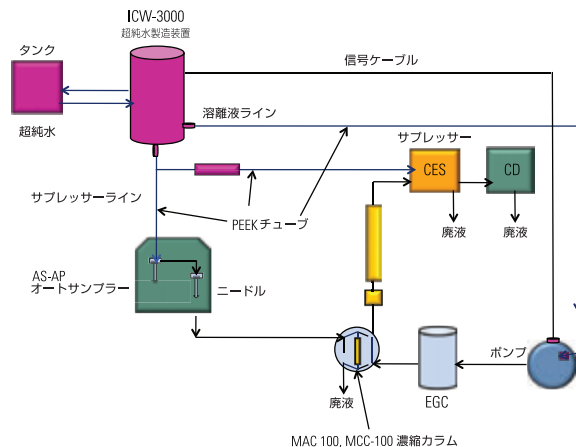


図1. Dionex ICS-5000+ キャピラリー IC システムの構成



図2. フラットフェラル

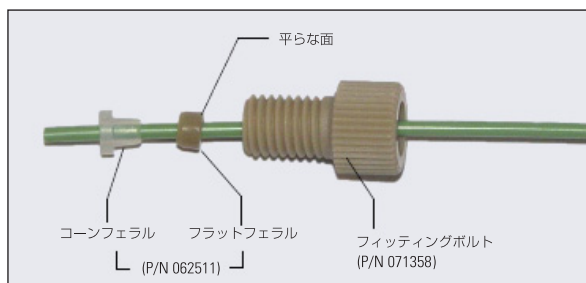


図3. フェラルの組み立て

1. チューブ:

- a. バッファーループラインや洗浄リザーバーラインなどで使用されているテフロン製チューブはすべて、緑色のPEEK製チューブの新品と交換します。
- b. 以前に、使用されたことのあるオートサンプラーで、その試料が入っていたバイアルがポリスチレン製のものの以外の場合は、
 - 1) サンプリングニードルから注入ポートまでのPEEK 製チューブを新品のPEEK製チューブと交換します。
 - 2) 分流バルブが使用されている場合は、サンプリングニードルから分流バルブまでと分流バルブから注入バルブまでのPEEK製チューブを交換します。

2.大容量ループ注入および濃縮モード注入のための設定

- 操作マニュアル⁸に従って、プッシュモードまたはプッシュシーケンシャルモードで、Dionex AS-APオートサンプラーを接続します。
- オートサンプラーをChromeleonソフトウェアで設定します。詳細は、Dionex AS-APおよびChromeleonソフトウェアのマニュアルを参照してください。
- Chromeleonソフトウェアマニュアルを参考にして、サーバーの設定で「セグメント/ポンプとのリンク」を設定します。
 - 「セグメント/ポンプとのリンク」ページで、トレイタイプを選択します。
 - ポンプとのリンクは、「なし」を選択します。
 - モニタするリンク先は、「なし」を選択します。
(モニターリンクを「あり」にすると、pH/電気伝導度の機能が使用可能になります。しかし、この機能は、微量イオンの定量で一般に検出されるイオン強度の低い試料には対応していません。)
- 続いて「オプション」ページを設定します。
 - 導入モードは、「プッシュ」または「プッシュ（順次）」を選択します。
 - ディバーターバルブを使用する場合は、上側または下側バルブで「分流バルブ」を選択します。
 - バッファ容量は「1200 μL 」をシリンジ容量は「250 μL 」を選択します。
 - ループ容量については、通常のキャピラリーが大容量ループ注入の実際のループ容量を入力します。濃縮モードについては、濃縮する試料の量を入力します。サーバーの設定を保存します。

3.「ニードルアライメント」と送液ラインの校正

- 操作マニュアルと、Chromeleonオートサンプラーパネルのサンブラの位置調整画面で、ニードルのアライメント（位置合わせ）をします。
- オートサンプラーのフラッシュラインを1000 μL でブライミングします。Chromeleonオートサンプラーパネルにある「サンプラーTLVの校正」の指示に従って、送液ラインを校正します。

4.Dionex AS-APオートサンプラーを使用した大容量ループ注入の設定

- サーバーの設定: Dionex AS-APオートサンプラーの「オプション」ページの「ループ容量」欄に、ループの量を入力します。
- プログラムウィザード: 「サンプラーオプション」ページで、
 - 「注入モード」で「PushSequentialFull」または「PushFull」を選択します。
 - ディバーターバルブが使用されている場合は、「分流バルブ位置」で、「位置1」か「位置2」を選択します。
 - 「ループオーバーフィル」に、「10」を入力します。
- プログラムウィザード: 「サンプラーオプション」の2番目のページで、
 - 「洗浄容量」に「500.0」を入力します。
 - 「注入洗浄モード」で「両方」を選択します。
 - 残りののは、推奨値を使用します。

5.Dionex AS-AP オートサンプラーを使用した濃縮モード注入の設定: 濃縮量が多いときに高い再現性を得るためには、極めて多い量のパーシャルループ注入を行うものとして、オートサンプラーを設定します。キャピラリーの濃縮カラムを使用する際は、陰イオンを効率的に保持させるために遅いシリンジ速度で試料を送液する必要があります。

- サーバーの設定: 濃縮カラムへのパーシャルループ注入として、オートサンプラーを設定します。濃縮する量ではなく800 μL などの大きな値を入力します。
- プログラムウィザード:
 - 「注入モード」は「PushSeqPartial」または「PushPartial」を選択します。
 - シリンジの「採取」および「分注」の速度は、「2.0」($\mu\text{L}/\text{s}$)と入力します。
 - 「注入洗浄モード」は「両方」を選択します。
 - 「カット量」は「100」(μL)と入力します。
「ループ洗浄」係数は利用できません。
残りのフィールドは、推奨値を使用します。
- シーケンス: 濃縮する試料の量を入力します。

6.クリーンアップ:

- 汚染物質除去処理済みのバイアルまたは培養フラスコに、超純水を満たし、この中にPEEK製ニードルを一晚浸漬します。このニードルを取り付けた後、位置合わせを再点検します。
- 12,000 μL の超純水で、シリンジ、ニードル、バッファーループを繰り返しフラッシュおよびブライミングします。バッファーループをクリーンに保つことが重要です。
- ディバーターバルブを使用する場合は、両ポジションの間を超純水でフラッシュします。
- ニードルアセンブリーは周囲に水が貯まらないように、適切な排水ができるようにします。

7.バイアル、キャップ、セプタム:

- 使用するバイアルは、10 mLのポリスチレン製で、青色のセプタムが付いたものか、微量成分分析用の使い捨てPTFE製セプタムが付いたもののみにします。青色のセプタムよりも、使い捨てのPTFE製セプタムの使用が推奨されます。
- バイアルを取り扱うときは、必ず中央部から下の部分を持ちます。バイアルのネジ山には絶対に触れないでください。
- セプタムを取り扱うときは、必ずSS416製ピンセットを使用します。シンクや床に落ちたセプタムはすべて廃棄します。
- ニトリル製のクリーンルーム用手袋を必ず着用します。
- 微量成分分析に適したクリーン度を確保するには、バイアル、キャップ、セプタムを、超純水の流水で5回ゆすいだ後、汚染物質除去処理済みポリスチレン製容器の中で超純水に2〜3日間浸漬します。
- バイアル、キャップ、セプタムの汚染物質除去処理をした後、微量成分分析用のSS416製ピンセットをゆすぎ、このピンセットでキャップを外します。このキャップを超純水の流水でゆすぎます。キャップの水を振り切ります。キャップをもう片方の手に移します。このとき、キャップの縁に触れないように注意します。
- SS416製ピンセットを、超純水の流水でゆすぎます。このピンセットを使用して、青色またはPTFE製セプタムを取り出し、超純水の流水でゆすぎ、水を振り切り、汚染物質除去処理済みキャップにはめ込みます。このキャップを、汚染物質除去処理用容器に置きます。

- h. 洗浄容器内に残っている水に触れないように注意して、バイアルを取り出します。バイアルを超純水の流水で5回ゆすぎ、水を振り切ってから、試料を注入し、セプタム付きキャップをしっかり締めます。

キャピラリー IC システムを使用した微量成分分析

Dionex ICS-5000+キャピラリーICシステムは、質量感度が向上しているため、より少ない試料量で、従来の装置と同等の結果が得られます。たとえば、キャピラリーシステムにおける100 μ L の試料濃縮は、標準的なスタンダードボアシステムにおける10 mL に相当します。このような質量感度の向上によって、環境からの汚染が少量であっても検出されてしまうため、微量成分分析では、常に必要以上の注意を払い続けなければなりません。また、流量が少ないと、システムラインからの気泡抜きに時間がかかるため、必要以上に注意を払う必要があります。

キャピラリーICシステムで、良い結果を得るには、以下のことを守る必要があります。

- すべての接続部に、カット済みのチューブ、青色のコネクター、青色のフェラルを使用する。
- チューブとコネクターをまっすぐに接続して間に空隙ができないようにする。
- Dionex ICキューブ™ のすべての部品について、Dionex ICS-5000+の操作マニュアルに従い、水和および取り付けを行う。
- 初期稼働時と、システムに変化（ポンプの停止など）があった後は、念入りに気泡をシステムから除去する。システムのポンプは、ポンプ速度を増減させて圧力変動を防止できるように設計されています。これは役に立つ機能ですが、流量を安定化させる際の妨げになる可能性があります。この機能を無効にするには希望する流量を入力しポンプのスイッチを入れてすぐに切り、もう一度スイッチを入れます。

基本的な設置方法とポイントとなる微量成分分析の注意点の重要性を強調する意味で、このセクションでは、これらについて再度説明しました。Dionex ICS-5000+キャピラリーICシステムの消耗品（カラムなど）の詳細な取り付け手順については、Dionex ICS-5000+の設置マニュアルや操作マニュアルなどを参照してください。

大容量ループ注入と濃縮モード注入用の6ポートバルブの取り付け

0.4 μ L より注入量を多くする場合や濃縮カラムで大容量の試料を濃縮する場合には、6ポート注入バルブが必要です。一般に、Dionex ICS-5000+キャピラリーシステムについては、4ポートバルブが工場でインストールされます。ただし、この構成は必要に応じて変更することができます。4ポートバルブを6ポートバルブに交換するときはDionex ICS-5000+の操作マニュアルに従ってください。

フィッティングとチューブ

正しいクロマトグラムを得るには、カット済みのチューブを用いてフィッティングを適切に取り付けることが必要です。また、コネクターとフェラルに対し、汚染物質除去処理を施し汚染物質の混入を最小限に抑える必要があります。

1. キャピラリーICシステム用に設計された青色のフェラルとコネクターのみを使用します。汚染を最小限に抑えるには、汚染物質除去処理済みポリスチレン製容器にフェラルとコネクターを浸漬します。

2. キャピラリーICキットに同梱された、カット済みの青色のチューブのみを使用します。可能であれば、試料ループ用のチューブは、カット済みのものを使用します。カット済みチューブは末端が平らであるため、チューブとコネクターの間の空隙が最小限になります。
3. 正しいクロマトグラムをキャピラリーICシステムで得るには、Dionex ICS-5000+の操作マニュアルに従って、どの接続部にも空隙が生じないようにシステムを接続することが重要です。
 - a. たとえば、カット済み青色のチューブをキャピラリーポンプミキサーとキャピラリー Dionex EGCカートリッジの間に取り付け、次いでキャピラリーDionex CR-TCを取り付けるには最初にポンプのスイッチを入れ、チューブから液体が途切れずに流れ出すまで待ちます。
 - b. コネクターとフェラルをチューブに通して、チューブの先端がフェラルより2 mm 以上出るようにします（図4）。（適切に接続するためには、チューブがフェラルから出ている長さが5 mm 必要です。）
 - c. チューブをキャピラリーDionex EGCカートリッジの入口ポートに挿入します。チューブをしっかり握って入口ポートに密着させ、指を使ってできる限り強く、コネクターにねじ込みます。レンチを使用して、さらに3/4回転ねじ込みます。
 - d. 出口ポートが液体で満たされ、キャピラリーDionex EGCカートリッジから液体が流れ出すまで待ってから、次のチューブを同じ手順で接続します。
 - e. チューブを接続する間、および何らかの理由でポンプを再稼働したときは、この手順に従います。システムに空気が入り込まないように、常に注意を払ってください。
 - f. ポンプ停止後の空気混入を最小限に抑えるには、まず、デガスからインジェクションバルブへのチューブを取り外します。ポンプのスイッチを入れ、適切な接続の手順に従って、キャピラリーDionex CDの検出器からサブレッサーの再生チューブまでの最終接続部まで、すべての接続を順番にやり直します。この手順で流路に十分な注意を払うことで、気泡が混入するのを、最小限に抑えることができます。
 - g. 保持時間の再現性が悪い場合は、気泡がインジェクションバルブに付着している可能性があります。気泡をバルブからフラッシュするには、一時的に流量を15～20 μ L/分に上げます。



図4. A) 良い例 B) 悪い例

キャピラリー炭酸除去デバイス Dionex CRD

微量陰イオン分析では、試料からの炭酸イオンピークが極めて大きく、検体によっては目的ピークの定量化が妨げられることがあります。したがって、炭酸除去デバイス Dionex CRD200を取り付ける必要があります。

分離カラムと濃縮カラム

微量成分分析用として推奨されているカラム（例：キャピラリーカラム Dionex IonPac AS15、AS19、モノリス型濃縮カラム Dionex IonSwift MAC-100など）を選択します。

一般的なシステムの洗浄

微量イオン分析をするためには、特に装置をクリーンに保っておく必要があります。一般に、インジェクションバルブ、ディパーターバルブ、PEEK製ニードル、チューブは、さらに汚染物質除去処理が必要な可能性があります。ICW-3000超純水製造装置のタンクの水は、微生物による汚染を最小限に抑えるため、新鮮な超純水に毎月入れ替えます。

1. ICW-3000超純水製造装置のタンクの水を入れ替えた後、溶解液ポンプの気泡抜きをおこない、ポンプを再稼働します。空気の混入を最小限に抑えるには、ポンプから最終接続部まで配管を取り外し、適切な手順で再接続します。
2. 大容量ループ注入の場合、「大容量ループ注入」のセクションに記載した手順に従って、目的の試料ループを取り付けます。濃縮モード注入の場合、クリーンであることが確認済みの10～100 μL 試料ループを一時的に取り付けます。
3. サプレッサーの入口をインジェクションバルブの出口に直接接続して、分析カラムをバイパスさせます。
4. システムから汚染物質を除去するには、流量を20 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、溶離液濃度を100 mmol/L、サプレッサーの電流を25 mAに設定して、ベースラインのモニタリングを2～3時間行います。15～30分ごとに、インジェクションバルブのポジション（load および injection）を交互に切り替えます。両方の位置における電気伝導度が0.7 μS 未満になるまで、この切り替え操作を続けます。
5. ポンプを停止後、インジェクションバルブからデガスの出口を外し、ポンプをONにします。「フィッティングとチューブ」のセクションで述べた適切な接続の手順に従って、流路のフィッティングを順次緩め、接続し直します。このように流路に十分に注意を払うことで、気泡が混入するのを、最小限に抑えることができます。

大容量ループ注入

大容量ループ注入を適切に行うには、システムをクリーンに保っておくこと、試料ループをチューブとポートの間に隙間なく取り付けることが必要です。このセクションでは試料ループの取り付けについて簡単に説明し、サーバーの設定、プログラムウィザード、シーケンスにおける重要なソフトウェアの設定についてまとめます。Dionex AS-APオートサンプラーでは、注入量が試料ループ量と試料注入モードに合致しているかが検証されます。必要なセットアップコマンドをこのセクションにまとめます。

1. カット済みの試料ループを使用する必要があります。「フィッティングとチューブ」のセクションで述べた手順に従って、試料ループをインジェクションバルブのポート1とポート4に取り付けます。

2. Dionex AS-AP オートサンプラーの設定：「大容量ループ注入および濃縮モード注入のための設定」のセクションを参照してください。

- a. サーバーの設定：Dionex AS-APオートサンプラーの「オプション」ページの「ループ容量」には、注入する量を入力します。
- b. プログラムウィザード：「サンプラーオプション」ページで、「注入モード」には「PushSequentialFull」または「PushFull」を、「注入洗浄モード」には「両方」を選択します。

3. シーケンス

- a. 注入量をシーケンスに入力します。
PushSequentialFullモードとPushFullモードでは、注入量はサーバーの設定で入力した注入ループ量と同じである必要があります。2つの値が異なると、シーケンスは開始されません。

モノリス型濃縮カラムを使用した大容量注入

このセクションでは、モノリス型濃縮カラムの取り付けについて説明し、次いでサーバーの設定、プログラムウィザード、シーケンスの重要なコマンドについて簡単に概要を述べます。Dionex IonSwiftモノリス型陰イオン濃縮 (MAC) カラム (図 5) は、空隙が極めて少なく、かつ背圧が小さくなるように設計されており、キャピラリーICにおける濃縮分析のアプリケーションで用いられます。また、Dionex IonSwift MAC濃縮カラムは、ブランクにおけるベースラインへの硫酸イオンの混入が最小限に抑えられるように設計されています。モノリス型濃縮カラムはチューブとポートの間に空隙ができないように取り付ける必要があります。



図5. Dionex IonSwift濃縮カラム

「フィッティングとチューブ」のセクションと製品マニュアル¹²の手順に従って、モノリス型濃縮カラム（陰イオン用のDionex IonSwift MAC-100）を、インジェクションバルブのポート1とポート4に取り付けます。



図6. ICキューブインジェクションバルブのポート1とポート4に取り付けられたDionex IonSwift濃縮カラム

大容量ループ注入はブルモードでも使用できます。その場合はインジェクションバルブの排液ポートからサンプルを吸収して、試料を試料ループに充填します。この方法を用いるときは、AS-APオートサンプラーの製品マニュアルに従ってチューブの接続をやり直し、前のセクションで述べたコマンドの名前をすべて、プッシュモードからブルモードに変更します⁸。

1. 同梱のマニュアルに従って、カラムのコンディショニングを行います。
2. Dionex AS-APオートサンプラーの設定: 「大容量ループ注入および濃縮モード注入のための設定」のセクションを参照してください。
 - a. サーバーの設定: オートサンプラーの「オプション」ページの「ループ容量」で、濃縮する量を入力します。
 - b. プログラムウィザード: 「サンプラーオプション」ページで、「注入モード」は「PushSequentialConcentrate」または「PushConcentrate」を、「注入洗浄モード」は「両方」を選択します。
 - c. シーケンス: 濃縮する試料の量を入力します。「PushSequentialConcentrate」モードと「PushConcentrate」モードでは、注入量は、「サーバーの設定」プログラムに入力した注入ループ量と同じでなければいけません。2つの値が異なると、シーケンスは開始されません。

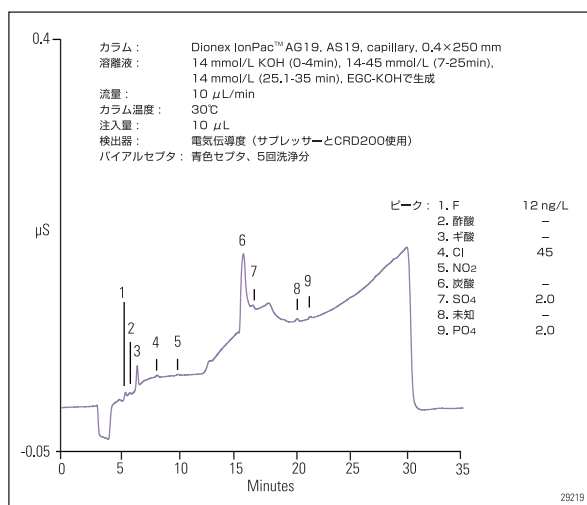


図7. 試料10 μL を直接注入したときの超純水中の微量陰イオン

結果と考察

微量イオンの定量に多く用いられている方法では、試料の直接大容量注入か、濃縮カラムへの濃縮のいずれかが行われています。本テクニカルノートでは、この2つの技法を用いて、キャピラリーICシステムで微量イオンの定量を行いました。

ループ注入による検量線の作成

ループ注入における検量線の作成は、異なる濃度レベルの標準液を使用して、標準的な方法で行われます。一般には、定量限界よりわずかに高い濃度から、未知の試料の最高推定濃度よりわずかに高い濃度までの、3~5種類の標準液を1回または複数回注入して、ピーク面積応答と濃度の検量線を作成します。

ループ注入によるクロマトグラム

上述したキャピラリーICの例として、キャピラリーシステムに10 μL 直接注入したときの結果を、図7~8に示します。10 μL は、普通は大容量とはみなされませんが、キャピラリーICでは、4 mm 内径のスタンダードボアシステムにおける1000 μL 、2 mm 内径のマイクロボアシステムにおける250 μL に相当します。図7は溶離液ジェネレーターで自動生成したKOH溶離液のグラジエントを使用してキャピラリー Dionex IonPac AS19カラムで、超純水ブランク中の微量陰イオンを測定した結果です。塩化物、硫酸、およびリン酸などの各陰イオンが、ng/L という低い濃度で検出されています。約1 $\mu\text{g/L}$ の陰イオン混合標準液についても、同様の分離結果が示されました (図8)。

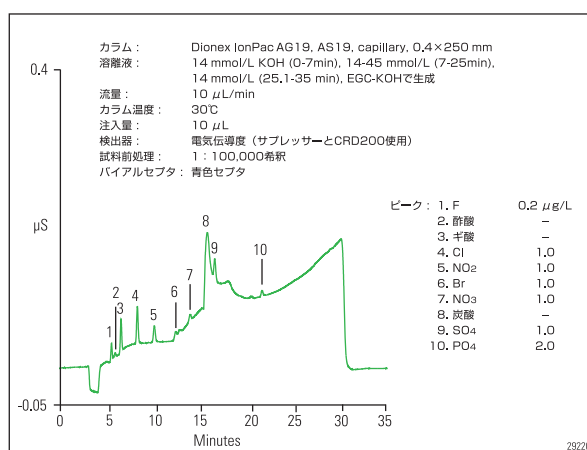


図8. 希釈したDionex陰イオン7種混合 II 標準液の直接注入

濃縮による大容量注入

より大きな容量を注入するときは、濃縮カラムを用いると、イオンを効率よく濃縮して測定することができます。空隙容積の少ないモノリス型イオン交換カラム (例: Dionex IonSwift MAC-100) は、キャピラリーICの濃縮カラムとして使用できるように最適化されています。試料は濃縮カラムに通すことにより、イオンは濃縮カラムに保持され、水は濃縮カラムを通過して排出されます。インジェクションバルブを切り替えると、溶離液によってイオンが濃縮カラムから溶出され、ガードおよび分離カラムへ送られます。イオン類だけを濃縮できるため、ピーク応答は、一般に3〜5倍に上昇します。

濃縮による検量線の作成

濃縮で検量線を作成するときは、同一バイアルに入った同一の検量用標準液について、様々な量を濃縮します (例: 約 0.5 $\mu\text{g/L}$ 濃度の混合標準液について、50、100、200 μL の3種類の量をそれぞれ濃縮する)。濃縮で検量線を作成すると、ピーク応答の直線性と濃縮カラムの効率の両方を検証できます。ただし、この方法は、検量用標準液の濃度に誤差があると適切な検量線が得られないため、この濃度が正確になるように特別な注意を払う必要があります。実験では、繰り返し注入した濃縮量の異なる3点で直線性が認められ、0.9993〜0.9999の決定係数 (r^2) が得られています。

濃縮分析によるクロマトグラム

以下にキャピラリーICの例を示します。図9と図10は、それぞれ200 μL と100 μL の試料を、Dionex IonSwift MAC-100陰イオン濃縮カラムで濃縮してから、キャピラリー Dionex IonPac AS15カラムで分離した例です。溶離液には、溶離液ジェネレーターで自動生成した38 mmol/Lの水酸化カリウム溶離液を用いました。キャピラリーシステムの場合、濃縮された200 μL という量は、スタンダードまたはマイクロボアシステムでは、それぞれ20 mL と5 mL に相当します。図9は、Dionex IonPac AS15カラムで、超純水中の微量陰イオンを分離した例です。塩化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオンの濃度は約25 ng/L でした。この超純水は、PTFE製のテフロンセプラムを取り付けた10 mL バイアルから注入しました。約0.1 $\mu\text{g/L}$ 濃度の陰イオンの混合標準液を100 μL 濃縮した例を、図10に示します。

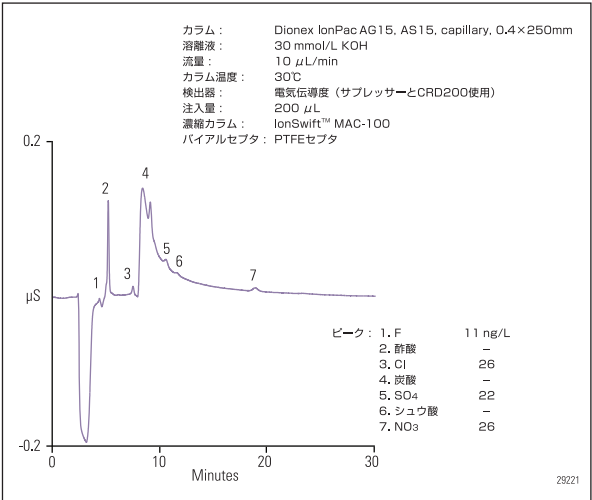


図9. 試料200 μL をDionex IonSwift MAC-100カラムで濃縮したときのブランク水中の微量陰イオン

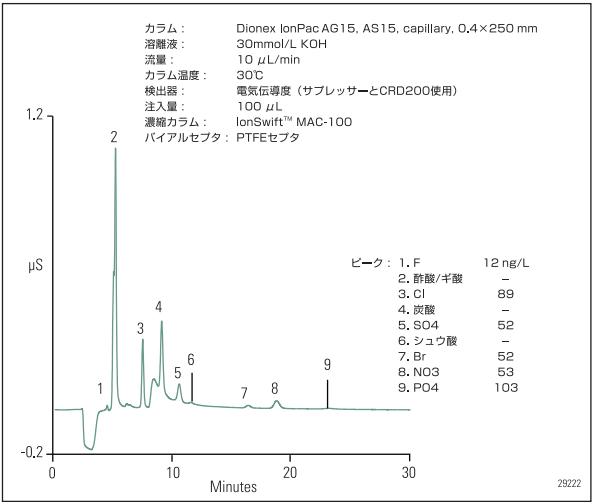


図10. 試料100 μL をDionex IonSwift MAC-100カラムで濃縮したときの標準液中の微量陰イオン

微量分析の注意点

超純水中の、 $\mu\text{g/L}$ ～ ng/L という低い濃度レベルの微量イオンや超微量成分の分析は、汚染の回避、適切な器具の使用、装置の適切なセットアップなどが必要です。

おわりに

超純水中の微量陰イオンが、Dionex ICS-5000+キャピラリーICシステムとDionex AS-APオートサンプラーを用いた直接注入によって定量できることが示されました。本テクニカルノートでは、より正確な結果を得る上でキャピラリーICと微量イオンの定量についての重要なポイントを詳細に述べました。また、試料の注入をよりクリーンかつ迅速に行えるように設計されたDionex AS-APオートサンプラーについて述べました。結論として、キャピラリーICは、スタンダードボアシステムやマイクロボアシステムと同等の結果が得られ、長期連続稼働、使用溶離液やサンプル量、および排液量の削減というメリットも得られます。

参考文献

1. Thermo Fisher Scientific. Dionex Technical Note 48, Determination of $\text{p}b\text{O}$ Trace Anions in High-Purity Water by High-Volume Direct Injection $\text{p}b\text{O}$ with the EG40, Dionex LPN 1127, Sunnyvale, CA, 2001.
2. Thermo Fisher Scientific. Dionex Application Note 113, Determination of Trace Anions in High Purity Waters by High Volume/Direct Injection Ion Chromatography, Dionex LPN 0796, Sunnyvale, CA, 1996.
3. Thermo Fisher Scientific. Dionex Application Update 142, Improved Determination of Trace Anions in High Purity Waters by High-Volume Direct Injection with the EG40, Dionex LPN 1291, Sunnyvale, CA, 2001.
4. Thermo Fisher Scientific. Dionex Application Note 146, Determination of Trace Anions in High-Purity Waters by Ion Chromatography with IonPac AS17 Using High Volume Direct Injection with the EG40, Dionex LPN 1507, Sunnyvale, CA, 2003.
5. Thermo Fisher Scientific. Dionex Application Update 157, Using a Reagent-Free Ion Chromatography System to Monitor Trace Anion Contamination in the Extracts of Electronic Components, Dionex LPN 1853, Sunnyvale, CA, 2006.
6. Thermo Fisher Scientific. Dionex Application Note 222, Determination of Parts-Per-Trillion Concentrations of Strontium by Pre-Concentration with Ion Chromatography and Suppressed Conductivity Detection, Dionex LPN 2182, Sunnyvale, CA, 2009.
7. Thermo Fisher Scientific. Dionex Application Update 169, Determination of Silicate and Inorganic Anions in High Purity Water Using Sequential Detection and AutoPrep, Dionex LPN 2188, Sunnyvale, CA, 2009.
8. Thermo Fisher Scientific. Dionex ICS Series AS-AP Autosampler Operator's Manual, Dionex Doc. No 065361, Sunnyvale, CA, 2011.

これはTechnical Note 112を翻訳したものです。

©2013 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

- ここに記載されている会社名、製品名は各社の登録商標または商標です。
- ここに記載の内容は、改善のために予告なく変更することがあります。
- ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

日本ダイオネクス株式会社

Part of Thermo Fisher Scientific

□本 社	〒532-0011	大阪市淀川区西中島6-3-14 DNX新大阪ビル	TEL (06) 6885-1213 FAX (06) 6885-1477
□東京支社	〒110-0015	東京都台東区東上野4-24-11 NBF上野ビル	TEL (03) 5826-2201 FAX (03) 5826-2202
□名古屋営業所	〒450-0002	名古屋市中村区名駅3-16-3 名駅アイサンビル	TEL (052) 571-8581 FAX (052) 571-8582
□大阪営業部	〒532-0011	大阪市淀川区西中島6-3-14 DNX新大阪ビル	TEL (06) 6885-1335 FAX (06) 6885-1215
□九州営業所	〒812-0011	福岡市博多区博多駅前2-20-1 大博多ビル8階	TEL (092) 271-4436 FAX (092) 262-0737

※2013年4月より住所が変更になりました。

テクニカルサポートセンター フリーダイヤル ☎ 0120-177-611 FAX (06) 6195-1710
Dionex Technical Support Center (TSC) [受付時間] 9:00～17:00 (土日祝日、弊社休業日を除く)
(操作方法、アプリケーション、トラブルなどの技術的なお問合せ)

<http://www.thermofisher.co.jp/dionex>

Thermo
SCIENTIFIC
Part of Thermo Fisher Scientific