

thermo scientific



超入門! 分離と検出

～イオンクロマトグラフィー編

ThermoFisher
SCIENTIFIC

目次

はじめに	2
イオンクロマトグラフィーの概要	2
装置構成	3
イオン交換カラムによる分離	4
イオン交換分離モード	5
カラム分離に影響を与える因子	6
イオン交換基の結合方式	12
イオン交換体の立体構造	14
イオンクロマトグラフに用いられる検出器	15
イオンクロマトグラフ-質量分析計 (IC-MS)	19
エレクトロスプレーイオン化法	20
メイクアップ溶媒の添加	21

はじめに

イオンクロマトグラフィー (IC) は1975年にDr. H. Smallらによってイオン種成分を分離、検出する手法として発表されました。その同年にDionex Corporation社が設立され、イオンクロマトグラフは機器分析装置として製品化されました。

Dr. H. Smallらの発表の特長としては、初めからカラムとサプレッサー (除去カラム) を含むDual Column法を用いていた点が挙げられます。今日では多くのICアプリケーションでサプレッサーIC方式が採用されています。日本ではサプレッサーデバイスをを用いないノンサプレッサーIC方式も使用されています。イオンクロマトグラフィーは、「JIS K0127 イオンクロマトグラフィー通則」、「上水試験方法」などの公定法に採用されており、さまざまな分野で用いられています。

イオンクロマトグラフィーの概要

イオンクロマトグラフィー (IC) はイオン種成分を分離、検出する分析法として、液体クロマトグラフィー (LC) とは別に進歩してきた手法です。電解質水溶液 (溶離液) を移動相として、イオン交換体を充填したカラムを用いて、試料溶液中のイオン種成分を展開溶離させて分離をします。カラム溶出後にサプレッサーで分析種イオンの対イオンを交換し、バックグラウンド電気伝導度を低減して検出感度を高めます。多くのアプリケーションで使用されている検出器は電気伝導度検出器であり、その他には吸光光度検出器、電気化学検出器、質量分析計や蛍光検出器なども組み合わせて用いられています。

ICには以下の特長があります。

- イオン種成分を一斉に感度よく分析できる
- 異なった酸化状態のイオン種成分を同時に測定できる
e.g. 亜硝酸態窒素と硝酸態窒素、亜硫酸イオンと硫酸イオンなど
- 異なった価数のイオン種成分を同時に測定できる
e.g. 鉄の2価と3価、クロムの3価と6価など
- サプレッサーIC方式では、質量分析計への接続も簡単に行える

装置構成

ICは、主としてイオン種成分を測定する液体クロマトグラフィー（LC）の一種と位置付けられています。そのため、装置構成は基本的にLCと同じです。溶離液を送液するポンプ、試料を導入するインジェクター、目的の分析種を分離するカラム、分離した分析種を検出する検出器、得られたデータを解析するワークステーションから構成されています。

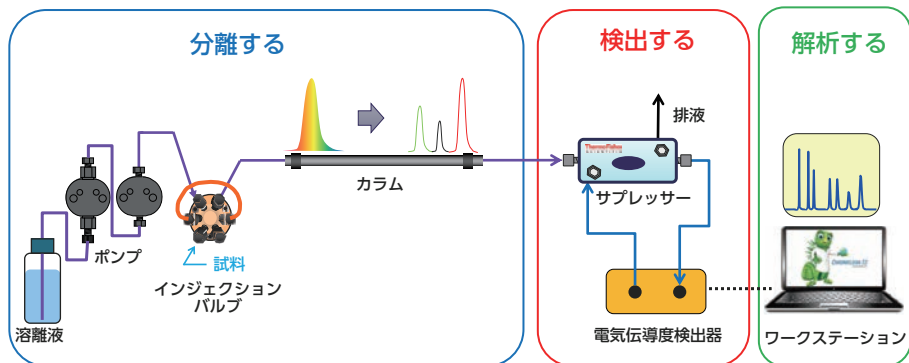


図1：イオンクロマトグラフの基本構成

ICとLCの異なる点は、1点目にサブレッサーデバイスが用いられていることです。2点目は分析目的種がイオン性成分であるため、ポンプや配管などの接液部分がすべて非金属製で、主にPEEK樹脂（ポリエーテルエーテルケトン）で構成されていることです。

装置構成について説明します。配管は、カラムや設定流量によって内径の異なるPEEK製チューブを使い分けます。標準的なカラムで設定流量0.75 mL/minから1.50 mL/minで、内径0.25 mm、外径1/16インチチューブが使用されます。設定流量0.1 mL/minから0.75 mL/min以下の場合、内径0.125 mmチューブを使用し、キャピラリーカラムでは内径0.06 mmのPEEK製チューブを使用します。送液部であるポンプはダブルプランジャータイプが主流で、主要部品（ポンプヘッド、チェックバルブなど）はPEEK製であり、高い耐圧を持ったポンプも作られています。試料を導入するインジェクターも、ローターシールやステーターはPEEK製です。

イオン交換カラムによる分離

ICでは電解質水溶液を溶離液に用いて、イオン交換体を充填したカラムによって分離を行う「イオン交換分離モード」がもっとも一般的です。その他には、「イオン排除分離モード」、イオンペア試薬を加えた溶離液を用いて分離を行う「イオンペア分離モード（逆相分配分離モード）」などがあります。

I.イオン交換分離モード

各分析目的イオン種のイオン価数、イオン半径、イオンの疎水性などのイオン交換体に対する静電的相互作用により分離します。

無機イオン種成分、有機酸イオン、アミン類、糖質など、幅広く低分子量イオン性物質の分析に使用します。

II.イオン排除分離モード

溶離液の酸濃度（pH）により解離抑制とイオン解離を繰り返しながらイオン交換体から排除される時間差により分離します。

酸性陽イオン交換体を充填したカラムで、分析目的イオン種が弱酸類や非イオン性成分の分離に使用します。

III.イオンペア分離モード（逆相分配分離モード）

イオン交換基を持たない合成樹脂体、またはシリカベースのオクタデシル基などを有するカラムを使用し、分析目的イオン種とイオン対を形成するようなイオンペア試薬を添加した溶離液を用いて分離します。

形成されるイオン対の疎水性度と合成樹脂体やオクタデシル基との疎水性相互作用により分離します。

比較的分子量の大きい成分や疎水性の高い成分の分離に使用します。

イオン交換分離モード

イオン交換分離モードでは、以下の項目が複雑に相互作用してイオン種成分が分離されます。この3つの要素を把握することで、分析目的に最適な条件を設定できます。

- A) 分析目的イオン種成分の価数、イオン半径と疎水性
- B) イオン交換体の官能基の種類と数
- C) 溶離剤イオンの種類と濃度

イオン交換分離モードでは、目的イオン種成分とイオン交換体、溶離液に含まれる溶離剤イオンの間に働く静電的相互作用により分離されます。この相互作用に影響を与える因子としてはイオンの価数、イオン半径、水和力などが挙げられます。イオンクロマトグラフィーで用いられる移動相（溶離液）は電解質水溶液で、アルカリ性や酸性の水溶液を使用します。基本的に陰イオン種成分を分析する場合、アルカリ性水溶液の溶離液、陰イオン交換体を充填したカラムを用います。一方、陽イオン種成分を分析する場合、酸性水溶液の溶離液、陽イオン交換体を充填したカラムを用います。目的イオン種成分は、イオンの価数やイオン半径、イオンの疎水性度と溶離剤の種類、濃度などでイオン交換体上に保持される時間に違いが生じます。この時間差で試料中のイオン種成分が分離されます。

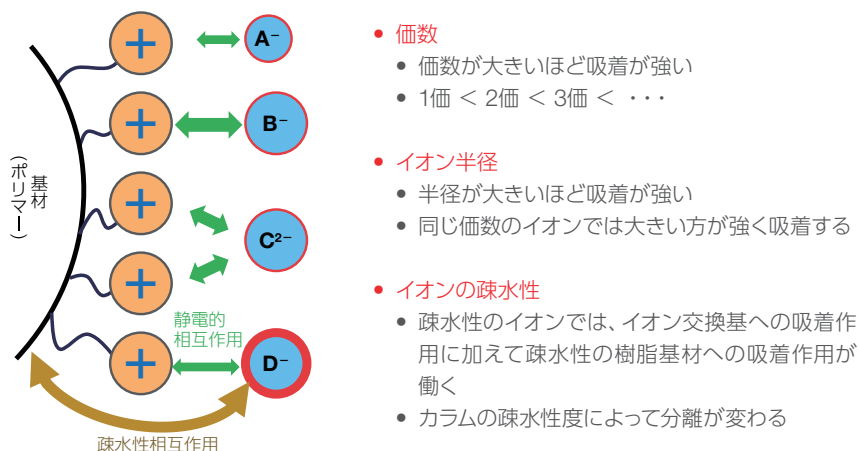


図2：イオン交換分離の原理

多様な目的イオン種成分に合わせて、当社はカラムのバリエーションを豊富に用意していますが、分析目的に適したカラムを選択するには経験を要します。イオン交換体の構造と性質を踏まえて、カラム選択の目安を後述します。

カラム分離に影響を与える因子

ここまででイオン交換原理について説明しました。次にイオン交換分離に影響する因子について説明します。

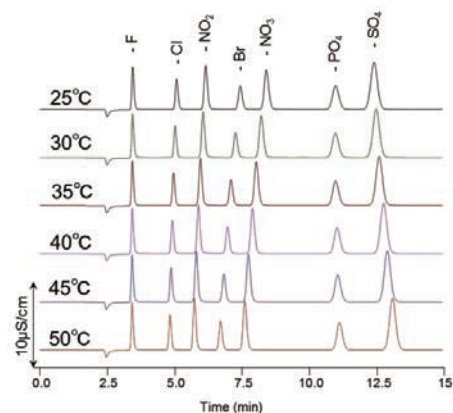
イオン交換分離に影響する因子は以下が挙げられます。

- A) 温度
- B) 溶離剤の濃度と種類（溶離液の種類）
- C) イオン交換容量
- D) イオン交換体の疎水性度

A) 温度

分離に影響する要因はいくつかあり、その一つが環境温度です。イオンクロマトグラフを設置する場所など、注意が必要な場合もあります。

溶離液は1 Lまたは2 Lのボトルに入れて装置の上部に置く場合があります。エアコンディショナーの送風が直接イオンクロマトグラフの溶離液ボトルに当たるような設置環境であると、分離に影響を与える場合があります。また、装置の設置場所が窓際や部屋の出入口付近にある場合なども注意が必要です。装置にカラムヒーターや恒温槽が付いていても、保持時間のバラツキ、分離度の日間変動が起こる場合があります。溶離液の種類、カラム物性によりその影響は異なりますが、炭酸系溶離液条件では、カラム温度が高くなると1価のイオンでは少し保持が短く、2価や3価のイオンでは保持が長くなります。



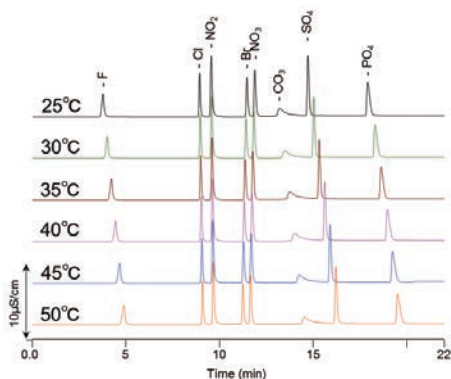
条件

カラム: Thermo Scientific™ Dionex™
IonPac™ AG22, 4 x 50 mm
Thermo Scientific™ Dionex™
IonPac™ AS22, 4 x 250 mm

溶離液: 4.5 mmol/L Na₂CO₃
1.4 mmol/L NaHCO₃

図3: 炭酸系溶離液条件でのカラム温度の影響

水酸化物系溶離液条件では1価のイオンであるフッ化物イオンだけ保持が強まり、他の1価のイオンは保持が弱まる傾向にあります。カラム温度による分離への影響は大きいものではありませんが、保持時間の再現性(定性の信頼性)に影響します。また、カラム温度を変えることで、分離の状態、ピーク形状の改善につながる場合もあります。



条件

カラム: Thermo Scientific™
Dionex™ IonPac™ AG17-C,
4 x 50 mm
Thermo Scientific™
Dionex™ IonPac™ AS17-C,
4 x 250 mm

溶離液: KOH

グラジエント条件: 0.5 mmol/L 0~4 min
0.5~32 mmol/L 4~17 min
32 mmol/L 17~22min

図4: 水酸化物系溶離液条件でのカラム温度の影響

B) 溶離剤の濃度と種類 (溶離液の種類)

溶離液の種類について説明します。陽イオン分析では、多くのアプリケーションでメタンスルホン酸を溶離液に使用しています。その他に、硫酸やリン酸を溶離液に用いる場合がありますが、特別な場合に限られます。

陰イオン分析の場合は、炭酸ナトリウムや炭酸水素ナトリウムを用いた溶離液、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムを用いた溶離液を主に使用します。その他に、四ホウ酸ナトリウムなどを溶離液に使用する場合があります。その溶離液の種類によって、カラムからの溶出力が異なり、分離状態の変更に使われることがあります。

溶離液の溶出力: $\text{NaOH} < \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 < \text{NaHCO}_3 < \text{Na}_2\text{CO}_3$

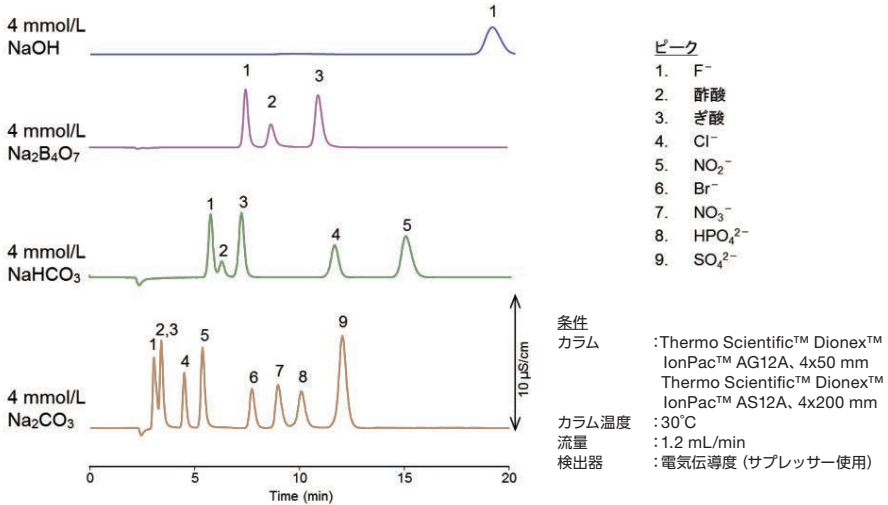


図5: 溶離液の種類と溶出力

水酸化ナトリウムや水酸化カリウムを溶離液に使用する場合の溶離剤イオンは、「 OH^- 」イオンです。この溶離剤イオンを使用する溶離液はカラム溶出力が小さく、イオン交換容量によりますが、フッ化物イオンを中心にその付近に溶出するようなイオン種成分の分離に使用します。次に溶出力が弱いのは、四ホウ酸ナトリウムを用いた溶離液です。次いで、炭酸水素ナトリウムや炭酸水素カリウムを使用した溶離液です。1価のイオンである「 HCO_3^- 」イオンが溶離剤イオンです。そして、溶出力が一番強いのが、炭酸ナトリウムや炭酸カリウム溶離液です。2価のイオンである「 CO_3^{2-} 」イオンが溶離剤イオンとなります。炭酸系溶離液の場合、炭酸ナトリウムと炭酸水素ナトリウムの混合溶離液にして使用するのがほとんどです。この2種類の溶離剤を混合することで、溶離液のpHを調整しています。目的は、多段階解離をするリン酸イオンの溶出位置の調整です。溶離液pHが高いとリン酸イオンは3価のイオンとなり、保持が長くカラム溶出に時間を要します。溶離液pHを中性に近づけると2価のイオンになり溶出が早まります。このように、溶離液pHで分離を調節できることから、多くのアプリケーションで炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムの混合溶離液が用いられています。

次に溶離液の濃度について説明します。溶離液が原因で分離に問題が生じる場合、その多くは人為的な溶離液調製ミスによるものです。溶離液由来の分析トラブルを防ぐためには、装置立ち上げ時のバックグラウンド電気伝導度（トータル電気伝導度）を確認することが重要です。この数値は溶離液濃度に連動しています。調製ミスで濃度が高ければ、高

い伝導度を示し、濃度が低ければ低い値を示します。この数値が、前回分析時の値と同じであるかが判断基準になります。このバックグラウンド電気伝導度の値が異なる場合、溶離液を再調製してください。その際には、溶離液調製に使用する超純水の純度や器具の洗浄、保管の状態も確認することをお勧めします。

溶離液の調製ミスがあった場合、陰イオン分析では SO_4^{2-} イオンや HPO_4^{2-} イオンのピーク保持時間が、陽イオン分析では Mg^{2+} イオンや Ca^{2+} イオンの溶出位置がもっとも影響を受けます。溶離液濃度を変更して分析を行ったときのクロマトグラムの比較を見ると明らかです。クロマトグラムは、全体的に少しずつではありますが、溶離液濃度が高くなると保持が短くなります。しかし、1価のイオンと2価、3価のイオンではその移動度合いは同じではなく、価数が大きい方がより大きく保持時間が変動します。溶離液の濃度は1価や2価のイオンよりも、価数の大きいイオン種成分の方により大きく影響を与えます。このようなイオンの性質を利用した分析がグラジエント溶出です。

イオン種成分は、溶離液濃度が高いと保持が短くなります。カラムに展開する溶離液濃度を低くしておき、徐々に高くしていきます。その溶離液濃度に応じて、各イオン種成分はカラムから溶出していきます。保持の短いイオン種成分を分離させ、保持の長いイオン種成分を早く溶出させたい場合にはグラジエント溶出が有効な場合もあります。

溶離液ジェネレーターシステム (EG)

溶離液ジェネレーターシステム (EG) とは、超純水からインラインで溶離液を自動生成するシステムです。溶離液を毎回調製する手間と溶離液調製の日間差や個人差を減らし、高純度で再現性の高い溶離液生成を可能にします。高感度検出、高分離能を必要とするアプリケーションに必要とされ、質量分析計に接続する場合は必須なシステムとなります。

簡単にEGシステムを説明します。EG部ではポンプで送液される超純水と溶離液の元となる溶液から、設定濃度に合わせてイオンを電気的に泳動させ溶離液を調製します。EGシステムは溶離液を生成する高圧チャンバー、溶離液となるイオンを高濃度に含むボトル部から構成されます。この高圧チャンバー内 (液流路) には水の電気分解を行う電極、溶離液の元となる溶液との間にイオン交換膜が設置され、ボトル内にも電極が設置されています。

陰イオン分析を行うシステムを例に説明を加えます。ポンプで送液された超純水は高圧チャンバーに導かれ、チャンバー内に設置された陰極で供給された電流により、水の電気分解が起こり、 OH^- イオンを生成します。また、その電流量に比例した K^+ イオンがボトルからチャンバー内に泳動し、 KOH 溶離液となります。一方で、ボトル内の陽極では H^+ イオンが生成し、泳動した K^+ イオンの代わりに OH^- イオンと結合することになります。各電極に供給する電流値をコントロールすることで、任意の濃度 (0~100 mmol/L濃度まで) を調製することが可能となっています。

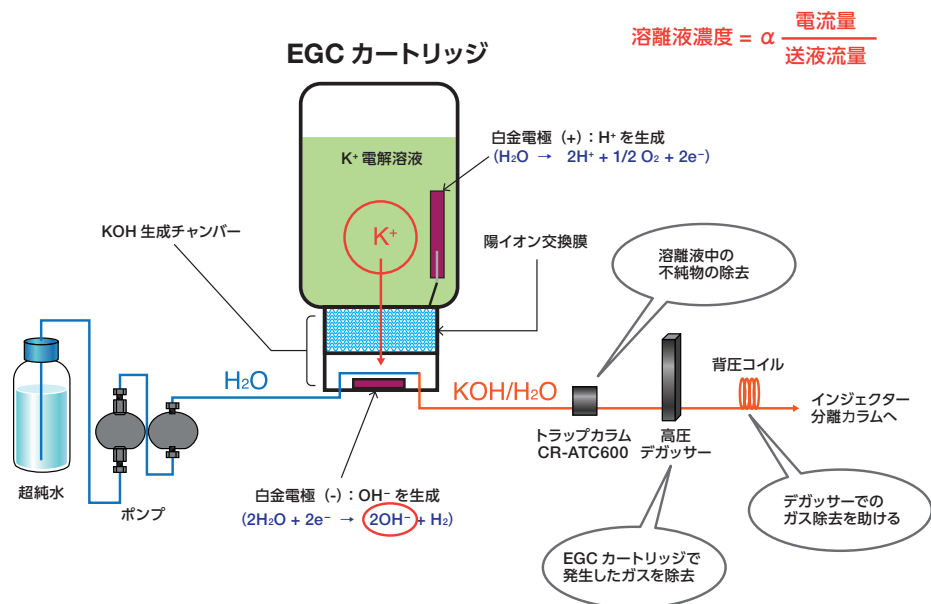


図6：溶離液ジェネレーターの構造と溶離液生成原理

EGシステムで調製できる溶離液の種類は、陰イオン分析では水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム/炭酸水素カリウム、陽イオン分析ではメタンスルホン酸です。

ICでは分析対象となっているイオン種成分は多岐にわたり、グラジエント分析が必要な無機陰イオンと弱酸類の同時分析やアミン類の分析のニーズが高まっています。従来はポンプミキシンググラジエントで行われてきましたが、複数の溶離液を組み合わせる必要があり、その溶離液の調製に時間を要し、再現性についてもいくつかの問題がありました。しかし、EGシステムを用いるグラジエント分析は簡単に濃度設定ができ、保持時間の再現性に優れた分析が行えるようになりました。陰イオン、陽イオン分析の両方でグラジエント分析に適したカラムの開発も進み、多くの試料、目的イオン種に合わせてカラムを選択することも可能です。

C) イオン交換容量

イオン交換容量はカラムの分離能を表す一つの指標です。イオン交換容量が高いカラムは、高濃度のイオン種成分、多数の種類のイオン種を保持する能力があり、イオン交換基が多く存在するので分離する力が高いカラムです。高濃度マトリックス試料において、その中の低濃度イオン種成分を分離したい場合などは、イオン交換容量の高いカラムでなければ十分な分離を得ることができません。その反面、溶離液濃度を高くしなければ、すべてのイオン種成分を溶出させられないこともあり、分析試料に合わせて、交換容量を選ぶ必要があります。

D) イオン交換体の疎水性

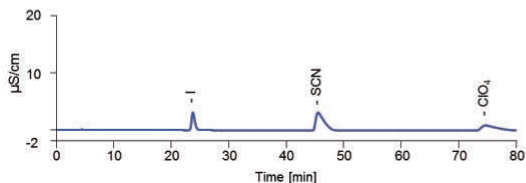
図7に示すクロマトグラムは、イオン交換体の疎水性の違いによるピーク形状や保持の違いを示しています。水酸化物イオンを溶離剤に使用した溶離液で使用されている2種類のカラムのクロマトグラムです。Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ AS20カラム (交換容量: 310 $\mu\text{eq}/\text{column}$, 疎水性: 超低) とThermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ AS11-HCカラム (交換容量: 290 $\mu\text{eq}/\text{column}$, 疎水性: やや低い) を比較しています。溶離液条件やカラム温度など同一条件でのクロマトグラムです。比較に用いたカラムは、交換体構造の違いはありますが、イオン交換容量など保持に大きく影響する因子はほぼ同じです。

A) Dionex IonPac AG20/AS20 疎水性: 超低



カラム : クロマトグラム参照
カラム温度 : 35°C
溶離液 : 35 mmol/L NaOH
流量 : 1.0 mL/min
検出器 : 電気伝導度 (サプレッサー使用)

B) Dionex IonPac AG11-HC/AS11-HC 疎水性: やや低い



カラム	交換基	交換容量 $\mu\text{eq}/\text{column}$	疎水性
Dionex IonPac AS20	第4級アルカノールアミン	310	超低
Dionex IonPac AS11-HC	第4級アルカノールアミン	290	やや低

図7: カラムの疎水性度が分離に与える影響

疎水性が高い交換体と疎水性の高いイオン種とでは、疎水性相互作用が強く働き、保持が強く起こります。疎水性の低い交換体と疎水性の高いイオン種とでは、疎水性相互作用は弱く働き、イオン性に依存した分離が起こります。これらの違いは、イオン交換体まわりの水和層の厚さに表れます。疎水性が低いイオン交換体では水和層が厚く、疎水性イオン種成分と交換体との疎水性相互作用が弱く働き、溶出が早くなると考えられます。

図7のクロマトグラムから、イオン交換体の疎水性により保持力に大きな違いが出る事が確認できます。イオン交換カラムの分離に影響するものとして、疎水性も考慮する必要があります。イオン交換体の疎水性が高いほど、その影響は大きくクロマトグラムに表れ、疎水性が低いほど扱いやすくなります。ただし、分析種イオンによっては、この物性を利用した条件を設定するとより良い結果を得られる場合もあります。分析種の疎水性にも注意が必要な場合があります。保持の長いイオン種は一般的にイオン半径が大きく、疎水性が高い傾向にあります。分析種成分の疎水性とカラムの疎水性度が合わない、分離やピーク形状が悪くなったり、分析時間も長くなる場合があり、定量分析に影響が出てきます。分析種成分の疎水性が高い場合、疎水性の低いカラムを選ぶことをお勧めします。反対に疎水性の低いイオン種成分を分離させたい場合は少しイオン交換容量の高い、疎水性の高いカラムを選ぶようにします。

イオン交換基の結合方式

Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™カラムシリーズではいくつかのイオン交換基の修飾方法を採用しています。代表的な修飾方法には、ナノビーズ凝集型、グラフト型、多分岐グラフト・レイヤー型があり、多様な試料に対応できるようにカラムのバリエーションをご用意しています。

I. ナノビーズ凝集型

ペリキュラー型とも呼ばれる形状のイオン交換体です。基材表層にスルホン酸型陽イオン交換基を化学修飾して、その陽イオン交換基とナノビーズと呼ばれる微小粒子型イオン交換体を、基材表層の陽イオン交換基と静電的に吸着凝集させて取り付けられているタイプです。ナノビーズは微小粒子基材（～500 nm）に第四級アンモニウム型陰イオン交換基を化学修飾したものです。このナノビーズに修飾されているイオン交換基で、分析イオン種のイオン交換反応が起こります。

特長	疎水性相互作用を利用した分離能を持つ 弱酸類と無機塩類をバランスよく分離する
----	---

II. グラフト型

イオン交換基を化学修飾した直鎖のリガンドを樹脂基材に直接取り付け付けたタイプのイオン交換体です。

特長 イオン交換容量の高い、疎水性相互作用を利用した分離能を持つ
 低分子陰イオン種成分をよく分離する
 陽イオン分離カラムに採用されている

III. 多分岐グラフト・レイヤー型

基材表面を親水性レイヤーで覆い、多層構造を有するように多分岐状にイオン交換基を配置したタイプのイオン交換体です。

特長 イオン交換容量の高い、親水性を利用した分離能を持つ
 親水性を最大限に利用した迅速分析に対応している
 陰イオン分離用カラムに採用されている

イオン交換体のベースである樹脂基材は、ポリエチルビニルベンゼン-ジビニルベンゼン共重合体やポリビニルベンゼン-ジビニルベンゼン共重合体を高い架橋度で合成することで、有機溶媒（極性溶媒など）に対する耐性を得ています。樹脂基材の疎水性が高くなることは、利点と欠点があります。それらをうまく利用して分離に生かす工夫が、上述の3つの構造設計に取り入れられています。樹脂基材の疎水性が及ぼす影響には分析種イオンの疎水性が関わります。疎水性イオンは疎水性を示すイオン交換体に長く保持され、親水性イオン交換体では、保持される時間が短くなる傾向にあります。保持時間はイオン交換体をデザインするときに考慮しなければならない項目の一つに挙げられ、分離条件を設定するときやカラム選択のときにも考慮しなければなりません。

Dionex IonPacカラムでは、イオン交換体の粒子径、イオン交換体構造を工夫することで、イオン交換容量や疎水性などを調整し、多様な分析試料、分析種イオンに合わせることができるよう多数のカラムバリエーションを揃えています。保持の長いイオン種を分析対象とするのであれば、交換体の物性として、低イオン交換容量、疎水性が低いカラムを選択します。保持の短いイオン種を分析対象とする場合は、高イオン交換容量、疎水性が高いカラムを選択します。カラム物性をうまく利用しながら分析条件を設定します。

イオン交換体の立体構造

イオン交換体に用いられている基材は、ポリエチルビニルベンゼン-ジビニルベンゼン共重合体やポリビニルベンゼン-ジビニルベンゼン共重合体などを用いた、球状樹脂基材です(図8)。その基材の大きさは、4 μm 径から15 μm 径ぐらいまでで、用途に合わせて用いています。

基材の大きさは、イオンクロマトグラフの装置耐圧に直結するとても重要なパラメーターです。分離に与える影響は大きく、小さい粒子サイズのイオン交換体は分離能が高くなる傾向にあります。イオン交換分離では、イオン種成分はイオン交換基上を吸着脱離の交換反応を繰り返し、カラム内を移動しながら分離します。イオン交換体の粒子径が小さくなると、交換基から次の交換基へイオンの移動する距離が短くなり分離能が向上します。

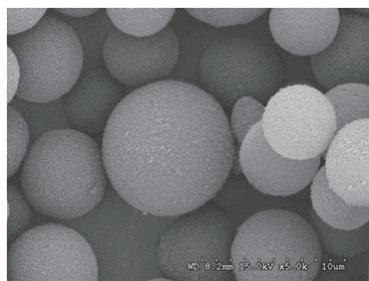
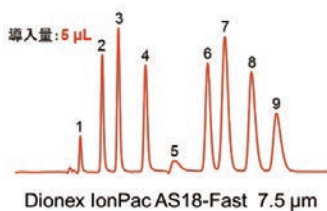
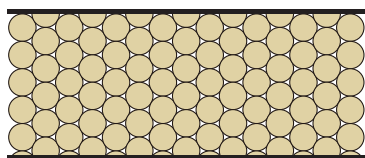


図8: イオン交換体

7.5 μm イオン交換体カラムと4 μm イオン交換体カラムの分離の比較を示します。ベースライン付近を比較すると4 μm の方の分離度が向上しています。

● 7.5 μm 樹脂



● 4 μm 樹脂

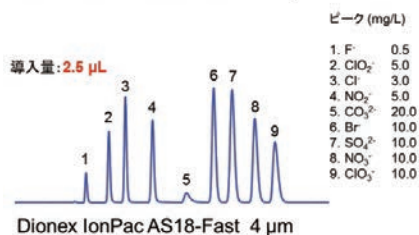
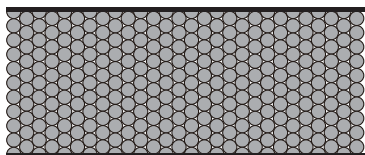


図9: イオン交換体の粒子径の違いによる分離比較

イオンクロマトグラフに用いられる検出器

電気伝導度検出器とサプレッサー

ICでは、ほとんどのアプリケーションで電気伝導度検出器が使用されています。この検出器の特長は、導電性の物質の非選択的・非破壊検出を行い、電極間を通過する電解質水溶液の電気の流れやすさをモニターするという点です。解離しない非イオン性物質や、解離性物質でも導電率が低いイオン種成分の応答性は低く感度が得られません。電気伝導度検出器は特定のイオンだけを検出するということはできないので、カラムで目的イオン種を分離することがとても重要になります。

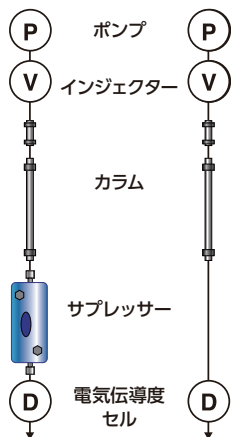
近年、サプレッサーICに質量分析計 (MS) を接続して行うアプリケーションが注目されています。質量分析計のイオン化法にはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) や大気圧イオン化法 (APCI) が用いられています。ノンサプレッサーICでは検出部に質量分析計を接続することができません。陰イオン分析、陽イオン分析、いずれの場合であっても、質量分析計導入前に溶離液を水にする (脱塩する) ことが必要です。炭酸溶離液条件でも、電気伝導度検出器の後に質量分析計を接続することは可能です。サプレッサーICではサプレッサー通過液は熱で揮散しやすくなる H_3CO_3 水溶液に変わるためです。

サプレッサーICからの水溶液を質量分析計へ導入しても、水の表面張力が大きいために、微細な液滴にならずイオン化しにくくなります。そのためイオンクロマトグラフー質量分析計 (IC-MS) ではメタノールやアセトニトリルのような溶媒をポストカラム添加します。電気伝導度検出器・質量分析計と2つの検出情報が得られ、定性・定量性がより向上します。

サブレッサーIC

サブレッサーICとノンサブレッサーICの違いは、カラムと検出器の間に、分析目的イオン種の対イオンを交換するサブレッサーがあるかないかです。

サブレッサーIC ノンサブレッサーIC



陰イオン分析ではサブレッサーICの比率が高く、ノンサブレッサーICのアプリケーションは減少傾向にあります。サブレッサーICとノンサブレッサーICは、それぞれ長所と短所があります。ノンサブレッサーICは溶離液に導電率の低い電解質水溶液を使用しなければなりません。その上で目的イオン種成分を分離させる組成を考えなければならず、使用するカラムの特性をよく知った上で経験も必要です。

図10: サブレッサーICとノンサブレッサーIC

対して、サブレッサーICは簡単な組成の強電解質水溶液を溶離液に使用できます。強電解質水溶液は電気伝導度検出で高いバックグラウンドを持ち、目的イオン種成分の検出を阻害する場合がありますが、サブレッサーは導電率の高い電解質水溶液を導電率の低い水溶液に変換する働きを持ちます。この働きにより、高いバックグラウンド電気伝導度を示すような炭酸ナトリウムや炭酸水ナトリウム混合水溶液を溶離液に使用できます。溶離液の組成や濃度について、クロマトグラムを見ながら直感的に条件の変更を検討できます。

サプレッサー

サプレッサーにもいくつかの方式があります。イオン交換体の充填されたカラム型、イオン交換膜型、電解膜交換型とさまざまな型があります。Thermo Scientific™ Dionex™ DRS 600サプレッサーは電解膜交換型とカラム型を組み合わせたハイブリッドサプレッサーです。図11に示すように、分析流路を挟むように2枚のイオン交換膜を配置し、交換膜の外側では水を電気分解して、溶離液中の分析イオン種の対イオンの交換に必要な水素イオンまたは水酸化物イオンを生成します。生成した水素イオンや水酸化物イオンは電気泳動によりイオン交換膜外側から、陽イオンは陰極へ、陰イオンは陽極へ泳動します。この過程で効率よく分析イオン種の対イオンの交換が行われ、バックグラウンドを下げる働きをします。これがサプレッサーの働きの一つです。

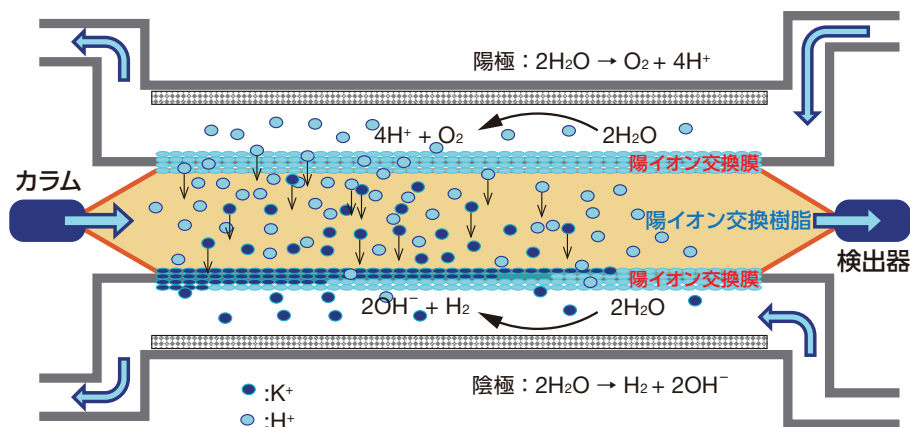


図11: 陰イオン分析用サプレッサーのサプレッションプロセス (水酸化カリウム溶離液の例)

検出の段階で溶離液の種類や濃度による影響が小さくなることからサプレッサーICのメリットは大きいと言えます。サプレッサーのもう1つの働きはバックグラウンド電気伝導度を下げる働きと併せて、目的イオン種成分の応答値を高めることです。

電気伝導度 Λ ($\mu\text{S} / \text{cm} \cdot \text{mol}^{-1}$) は陽イオンの伝導度 (λ^+) と陰イオンの伝導度 (λ^-) の総和で表されます。

$$\text{電気伝導度 } \Lambda = \lambda^+ + \lambda^-$$

また、各イオンの電気伝導度は当量当たりの伝導率 (モル伝導率) とイオン濃度の積で表わすことができます。イオン種ごとに無限希釈したときの当量当たりの伝導率 (極限モル伝導率) の値は異なり、つまり同じ濃度であればイオン種によって固有の電気伝導度を持つと言えます。そのため、電気伝導度検出器の電極間を通過するときに対になっている陰イオン、陽イオンの種類によって、得られる電気伝導度は変化します。

たとえば分析種を塩化物イオンと硫酸イオンとし、溶離液中の陽イオンが Na^+ である場合、ピークの示す応答値は

$$\text{Cl}^- \text{ 検出応答値} = \lambda^+ (\text{Na}^+_{50.11}) + \lambda^- (\text{Cl}^-_{76.31})$$

$$\text{SO}_4^{2-} \text{ 検出応答値} = \lambda^+ (\text{Na}^+_{50.11}) + \lambda^- (\text{SO}_4^{2-}_{80.0})$$

となります。ここでの括弧内の数値はそれぞれのイオンの極限モル伝導率です（化学便覧基礎編 改定5版より）。サプレッサーを通過すると、 Na^+ イオンがすべて H^+ イオンに変換されるため以下のようになります。

$$\text{Cl}^- \text{ 検出応答値} = \lambda^+ (\text{H}^+_{350.1}) + \lambda^- (\text{Cl}^-_{76.31})$$

$$\text{SO}_4^{2-} \text{ 検出応答値} = \lambda^+ (\text{H}^+_{350.1}) + \lambda^- (\text{SO}_4^{2-}_{80.0})$$

サプレッサーICで陰イオン分析を行うときは、溶離液と試料中の陽イオンを H^+ イオン（極限モル伝導率：350.1）に変換します。陽イオン分析では溶離液と試料中の陰イオンが OH^- イオン（極限モル伝導率：198）に変換されます。 H^+ イオンは陽イオンの中で、 OH^- イオンは陰イオンの中でもっとも極限モル伝導率が高いイオン種です。そのため、サプレッサー通過後の分析イオン種の検出応答値が高くなります。

さらに、サプレッサーを冷却することで、ノイズの低減を図ることができるため、コンポーネントクーラーを取り付けることをお勧めします。

イオンクロマトグラフ-質量分析計 (IC-MS)

サプレッサーの進歩によってイオンクロマトグラフと質量分析計 (MS) を接続するアプリケーションが発表されています。その多くは、液体クロマトグラフでは分離分析が得意ではない、極性低分子化合物、いわゆるイオン種成分の分析です。イオンクロマトグラフは移動相 (溶離液) に酸や塩基を用いて分離を行います。今までは溶離液が簡単な組成で、サプレッサー通過後に水になるようなイオンクロマトグラフィーはありませんでした。しかし、溶離液ジェネレーターの開発とサプレッサーの進歩により、当社のイオンクロマトグラフでは、IC-MSのシステムアップができるようになりました。また、炭酸系溶離液であっても、100%近くの陽イオン (対イオン) をヒドロニウムイオン (水素イオン) にイオン交換できるため、質量分析計と接続ができます。

非選択的検出器である電気伝導度検出器と、選択的検出器である質量分析計の2つの検出部を持つことで、2つのクロマトグラムを得られます。電気伝導度検出器のみの検出では、分析種定性のポイントはカラム分離でした。質量分析計を接続すると、質量での未分離のピークの成分定性が可能となり、外標準に頼っていたピークの定性がさらに高確度に行えるようになり、試料分析の多様な情報が得られるようになります。

イオンクロマトグラフでは極性化合物、イオン種成分の分離は難しいことではありませんでしたが、それらの検出が難しく、課題となっていました。そのため、分光光度検出器や蛍光検出器とポストカラム誘導体化法を組み合わせた分析手法が開発されてきました。しかし、質量分析計と組み合わせることで、分離後直接的に検出することが可能になります。バイオ生化学などの分野では、キャピラリー電気泳動 (CE) -質量分析計、LC (イオンペア分離) -質量分析計などの組み合わせで、多くのイオン種成分の分析が行われてきました。しかし、多くの課題があり、コストの面でも問題になっていました。IC-MSは現在、CE-MS、LC-MSに代わる方法として注目されています。

エレクトロスプレーイオン化法

質量分析計では分析成分を気相中でイオン化する必要があります。大気圧下でイオン化を行う大気圧イオン化法にはエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray ionization: ESI) と大気圧化学イオン化法 (Atmospheric pressure chemical ionization: APCI) の2つがあり、Thermo Scientific™ ISQ™ ECシングル四重極質量分析計ではESI法を採用しています。

一般的にESIでは試料溶液に高電圧を印加したキャピラリー先端からスプレーします。キャピラリーの外側から霧化ガス（シースガス）を流しスプレーすることで、印可した電圧と同符号の細かな帯電液滴が作られます。帯電液滴は移動の過程で溶媒の蒸発・表面電場の増加が進み、電荷同士の反発力が液体の表面張力を超えると分裂します。蒸発と分裂を繰り返すことにより、微細な液滴になり、最終的には試料イオンが気相中に放出されると考えられています（イオン蒸発）。

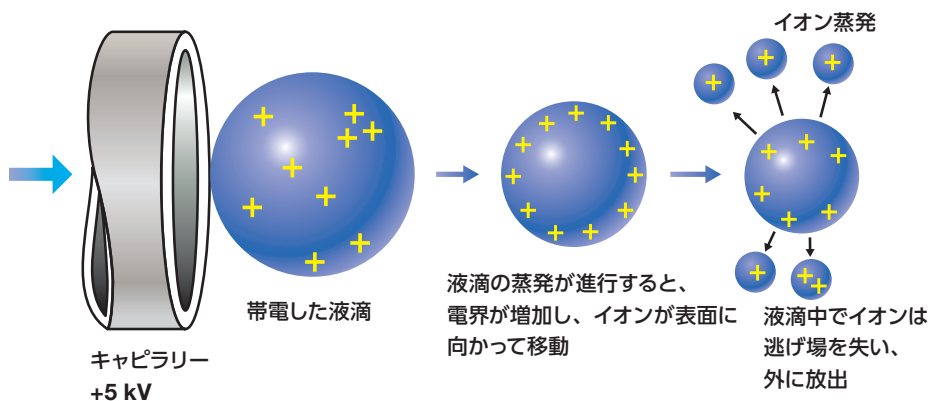


図12: ESIのメカニズム

ESIはもっともソフトなイオン化法で、ペプチドやタンパク質などの熱不安定化合物、代謝物などの高極性化合物、ニトロアレーンなどの難揮発性化合物やイオン性化合物に適用できます。生じるイオンは主に、プロトン付加分子、または脱プロトン分子で、複雑なフラグメントイオンが生じないので簡便に化合物の分子量が得られます。また、化合物によっては多価イオンが生じるため、高分子のタンパク質などの測定も可能です。

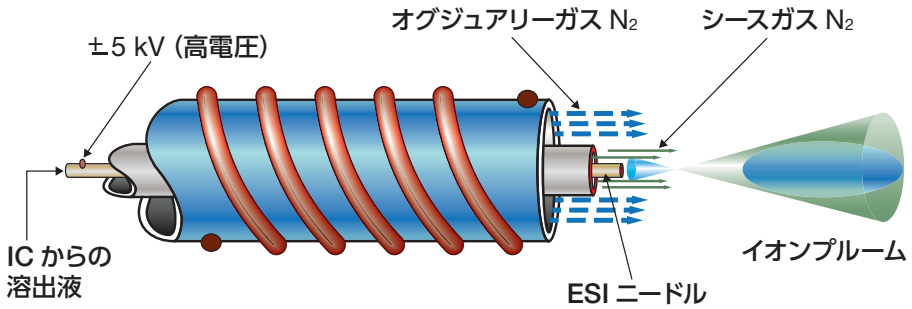


図13: 加熱型ESIプローブ (Heated-ESI) HESI

ISQ ECシングル四重極質量分析計はプローブヒーティング部とシースガスの供給部が改良された、ICに最適化された構造を採用しています。

メイクアップ溶媒の添加

IC-MSの問題点は、MSのイオン化部へ導入されている液が水である点です。質量分析計のイオン化部にはESI、APCIが用いられます。有機溶媒を含まない溶液では、表面張力が大きく微細な液滴になりにくく、イオン化されない状態になります。そこで、メイクアップ溶媒（シース液）を添加することで、水の表面張力を低下させ、微細液滴を形成させる必要があります。当社の装置では、V字型コネクタを使用してミックスする方法とプローブの先端でミックス噴霧する方法があります。マイクロボアカラムを使用する場合は、V字型コネクタを用いて添加する方法、キャピラリーICと接続する場合は、プローブ先端でのミックス噴霧を推奨しています。

ISQ ECシングル四重極質量分析計では、ICに最適化された噴霧部を採用しているので、必ずしもメイクアップ溶媒の添加は必要ありません。

© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.


実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc **IC253_A2103OB**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

 TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

 Analyze.jp@thermofisher.com

 facebook.com/ThermoFisherJapan

 @ThermoFisherJP

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)

ThermoFisher
S C I E N T I F I C