

Technical Review

HPLC分析の高精度化に影響を与える分析用水

黒木祥文

Effect of Impurities in Ultra-pure Water on Trace Organism Analysis by HPLC

Yoshifumi Kuroki

ORGANO CORPORATION, 2-8, Shin-suna, 1-chome, Koto-ku, Tokyo, 136-8631

Abstract

The quality of water has a significant influence on instrumental analyses.

In the microanalysis of trace organisms by HPLC or LC/MS, remaining organisms in the blank water should be decreased to less than 5 µg C/L(TOC). Today we can easily obtain the ultra-pure water of such a high quality for LC/MS using a water purifier with high performance.

However, we often make mistakes in the usage of ultra-pure water and also in the operation of a water purifier.

The manner to use ultra-pure water is quite important as well as the performance of the water purifier. It is necessary to make a standard method to use ultra-pure water for trace organisms analysis.

Keywords : HPLC, LC/MS, Ultra-pure water, TOC, Impurity, Contamination, Water quality, trace organisms.

緒言

HPLC分析において「水」は最もよく使われる試薬であり溶媒である。一般にHPLC分析にはボトル入りで市販されているHPLC用水を購入して使うか、超純水装置より採水して用いる。

一般に超純水装置は蒸留水、逆浸透水などを原水とし、活性炭、イオン交換樹脂およびフィルターの組み合わせによって精製が行われるが、紫外線(UV)ランプを採用した高性能機種が開発され、微量有機物分析に対応している。またボトル水も高感度LC/MS分析に対応したLC/MS用水も市販されている。

既に現在まで、超純水装置の性能は適切な機種の選定をすることで、分析用水として用いるに十分な水質を得られるよ

うになっている。しかしその装置の水質管理方法、使用方法には問題も多いことが指摘されている。[1]

本報ではHPLC、LC/MS分析に用いられる水の水質が分析に与える影響と、分析の精度向上に不可欠な使用方法の留意点を提示する。

1. 超純水の精製方法

水は複数の要素技術を用い多段階処理を経て精製される。処理技術により不純物に対する除去性能の違いがあり、組み合わせる際に注意が必要である。HPLC分析にとって主に問題となるのは有機物である。水中の有機物は逆浸透膜、イオン交換樹脂、活性炭などで除去できるが、超純水中の有機物低減には紫外線(UV)照射の効果が大きい。(Table 1)

オルガノ株式会社

〒136 8631 東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 8 号

TEL : 03-5635-5193 FAX : 03-3699-7220

E-mail : kuroki-y@organo.co.jp

Table 1. 水中の不純物と対応する水処理の要素技術

	濁質	微粒子	生菌	イオン類	シリカ	有機物	溶存ガス
塩素滅菌							
凝集沈殿 + ろ過							
加圧浮上 + ろ過							
凝集ろ過							
MF							
UF							
RO							
イオン交換 (再生型)							
イオン交換 (非再生型)							
EDI							
活性炭ろ過							
UV殺菌(254)							
UV酸化(185)							
UV酸化(365)+酸化剤							
真空脱気塔							
膜脱気							
脱炭酸ガス塔							

：主目的として設置

：主目的或いは付随的な効果を期待して設置

：付随的な効果あり

：機能はあるが、効果を期待すると本来の機能に問題を生じるもの

但し要素技術が、除去目的物質以外の物質の汚染リスクを持っていることに留意する必要がある。例えばイオン交換樹脂からは有機物の溶出があり、活性炭からはイオン類の溶出があることが知られている。

2. UV酸化による超純水中の有機物低減効果

185 nmの短波長紫外線を照射することで有機物を酸化分解することができる。(以下UV酸化) UV酸化は185 nmの紫外線により水分子あるいは溶存酸素から生じるヒドロキシラジカルの酸化力に因る。ヒドロキシラジカルにより有機物は完全にCO₂まで酸化分解されるか、有機酸としてイオン交換樹脂により除去される。

1次処理(純水装置)では総有機物濃度(TOC)としてお

よそ100 µgC/L程度残存している有機物を、UV酸化機能が無い超純水装置ではTOCを20~30 µgC/L程度にまで低減するのに対し、UV酸化機能を持つ超純水装置では5 µgC/L未満まで低減することができる。(Figure 1) これによりLC/MSをはじめとする、極微量有機物分析に最適な超純水を製造が可能となった。

3. 有機物低減が分析に与える影響

超純水装置にUV酸化機能を搭載することによりTOCを低減できるが、これがHPLC分析においてどのような影響を与えるかを示す。

Figure 2は超純水そのものの評価を行うために水100%での使用が可能なC30カラムを用い、サンプルインジェクション無しにブランクとして移動相だけを水100%からアセトニトリル100%へのグラジエントを行い、UV 210 nmの吸収をみたものである。「超純水TOC 1 ppb」は超純水装置PURE-LAB Ultra Analytic (英国ELGA社製)に搭載されている水質モニターでTOCが1 ppbを指したのを確認した後に採水したものをを用いた。「純水TOC 50 ppb」は純水装置PURELITE PRB 002 A (英国ELGA社製)から採水した水を用いた。TOCが1 ppbまで低減された超純水では全く見られないゴーストピークが純水からは検出された。水中のTOCは明らかにHPLC分析におけるバックグラウンドに影響を与えている。そのクロマトグラフ上の影響の差異についてもTOC値と相関が指摘されている。[4]

「JIS k 0557用水・排水の分析に用いる水」において微量分析に用いる水の品質を指すA4グレードではTOCを50

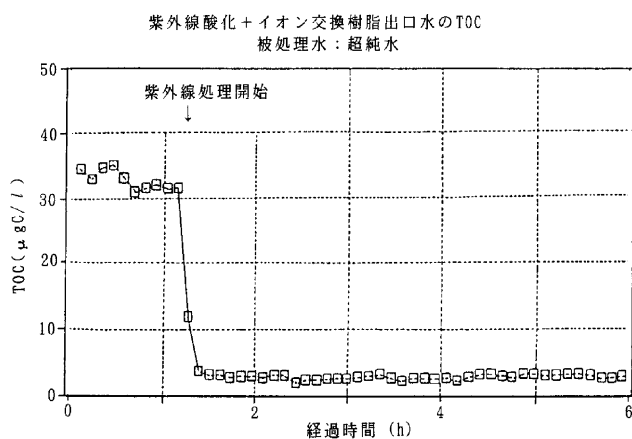


Figure 1. UV酸化によるTOC低減効果 [2]

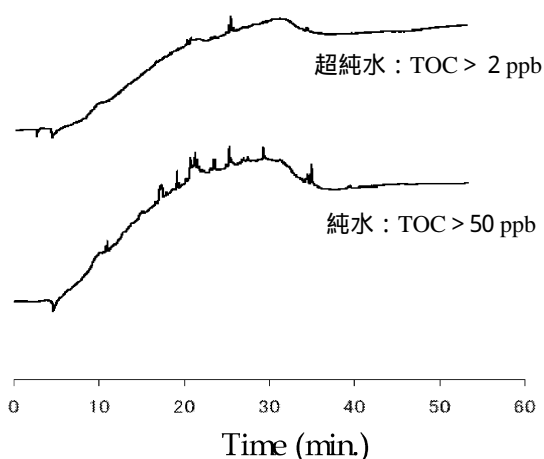


Figure 2. 純水の水質の違いによるHPLCバックグラウンドの違い [3]

μgC/L (50 ppb) 未満であることとしている。しかしFigure 2からもわかるように、HPLCで高感度分析を行なうのであればJISのA4を満たしていることでは不十分である。ブランクもしくはサンプル調製用水として用いた場合に実際の分析に影響を与えない水質かどうかあらかじめ試験しておく必要がある。

またLC/MSにおいてもUV酸化の有無がブランクのバックグラウンド、分析感度に影響を与えることが報告されている。[5]

以上から有機物を確実に除去した超純水を用いなければ、

HPLC、LC/MS分析におけるバックグラウンドを安定させることができず、分析の再現性を得ることができないと言えよう。

実際にHPLC分析に用いられている超純水システムと市販ボトル水(HPLC用蒸留水)の比較をした例を提示する。(Figure 3)

クロマトグラムは上から順にOrgano : PURELAB Ultra Analytic水、A : A社超純水装置水、B : B社HPLC用蒸留水(市販ボトル水)、C 18カラムにサンプルインジェクション無しで移動相水100% メタノール100%のグラジェントでブランクのUV 210 nmの吸収を比較した。特に水による有意差は認められない。HPLCやLC/MSを用いる分析においては、メーカーがHPLC用、あるいはLC/MS用と推奨する超純水装置なりボトル水を使用すればブランクとして問題なく使えると思われる。

但し水中の有機物が確実に除去されTOCが5 ppb未満まで低減されているかを常に確認する必要がある。そのため、以前より微量有機物分析用の超純水装置にはTOCモニターが装着されている。[6] また市販されているLC/MS用水も、TOC仕様(規格)もしくは品質管理に用いている。

4. 超純水の汚染要因

そして超純水装置からの採水時と採水後の水質汚染防止が非常に重要である。具体的には装置の管理が十分でない場合に起きる汚染、環境からの汚染、容器からの汚染、採水時の汚染など多岐にわたる。今回はその全てに関する解説は出来

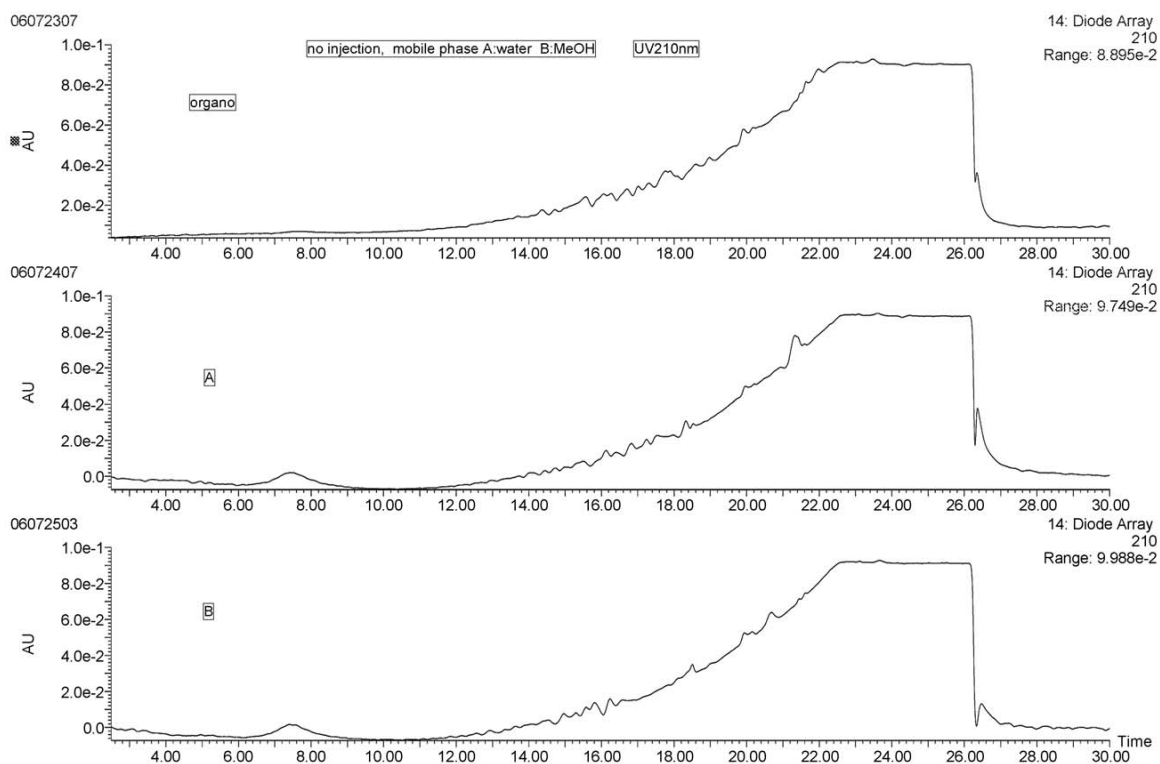


Figure 3. 超純水のクロマトグラム比較

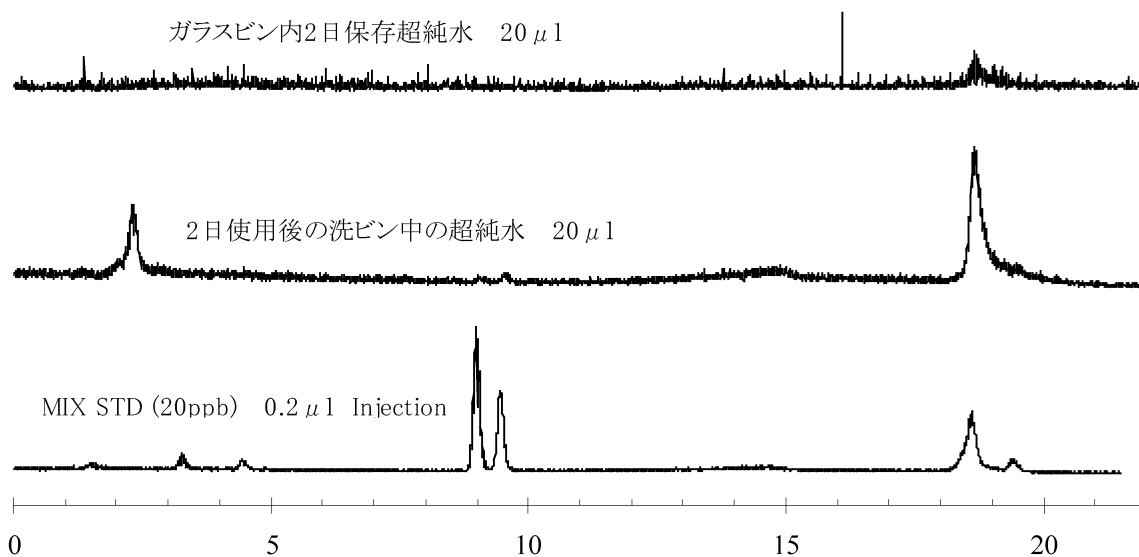


Figure 4. 洗ビンからのフタル酸エステル類の汚染例 [3]

ないが、見逃されがちな汚染要因を2例示す。

まず一例として洗ビンからの汚染を示す。洗ビンは実験や洗浄に広く用いられているが、弊社が環境分析などでHPLCを用いる研究者にアンケートを実施した結果では、全体の約10%しか使用前に洗ビンの水を入れ替えておらず、更に10%程度が毎日洗ビンの水を交換していると回答した。これでは洗ビン中の水質に配慮しているとは言えない。そこで一般的な使用例として想定できる2日間実験室で普段通りに使用した洗ビンの超純水と、2日間ガラスビンに封入した超純水をLC/MSで比較した。分析対象としてフタル酸エステル類を選定した。Figure 4に得られたTICを示す。一番下がフタル酸エステル6種の混合標準液をインジェクションしたものである。洗ビン中の超純水からは明らかにppbレベルのDi-*n*-octyl phthalateが検出された。[3][7]

これはボトル水の使用において問題となる開封後の保管、再使用にもあてはまる問題である。開封した分析用水の再使用は分析の精度に大きな影響を与えることを留意しなければならない。高感度分析用のボトル水は200 mL以下の低容量のタイプも販売されているので、その都度使い切ることを心掛けて、再使用はできるだけ避けるべきである。

もうひとつ超純水装置から超純水を採水する場合の注意点の一例を示す。超純水装置から超純水を容器に受ける際に普通に泡立ってながら採水した場合と、容器の壁を這わせるように超純水を採水して泡立たせなかった場合でも水質は変化する。

雰囲気からの汚染をイオンクロマトグラフィーによる陰イオン分析で比較した。クロマトグラムを重ねて表示しているが、下の明らかに泡立たせて採水した場合のほうが陰イオンを高い濃度で検出した。特に高いピークは亜硝酸イオンであった。(Figure 5)採水時に環境から巻き込んだものと考えられる。超純水装置から超純水を採水する場合には、なるべ

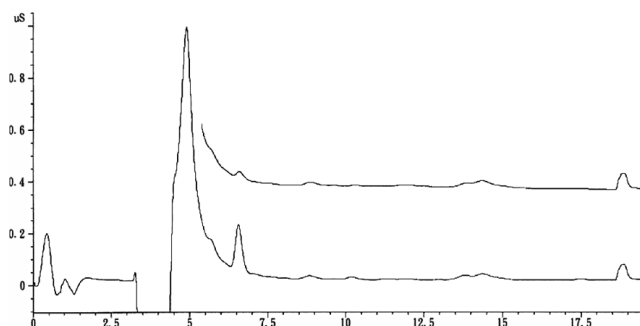


Figure 5. 採水方法の違いによる陰イオンクロマトの汚染例

く泡立せず、空気を混入させないことが重要である。このように採水方法の配慮が異なるだけで得られる超純水水質は異なってしまう。

汚染要因は分析の操作に数多く潜んでおり、管理、注意を怠ると分析の精度に大きな影響を与えかねないことを十分留意する必要がある。

5. まとめ

HPLC分析用水の選択には、高感度化に対応した超純水装置、対応するグレードのボトル水を選択し、超純水の水質をTOCによりモニタリングする必要がある。しかしそれ以上に、超純水装置、容器の管理、採水方法、使用方法が分析精度に大きな影響を与えていることを留意しなければならない。

謝辞

LC/MSを用いた超純水の水質比較において株式会社アイスティサイエンス 谷澤春奈様にご助言、データのご提供をいただきました。

引用文献

- [1] 黒木：工業用水，2003，541，24 - 30 .
- [2] オルガノ株式会社超純水編集委員会；オルガノ：超純水，1991，390 .
- [3] 鈴木・川口・榎並・黒木：第15回環境化学討論会講演要旨，2006，182 - 183 .
- [4] HPLC研究懇談会運営委員会；筑波出版会：液クロ
龍の巻，2002，70 - 71 .
- [5] HPLC研究懇談会運営委員会；筑波出版会：液クロ
龍の巻，2002，137 - 138 .
- [6] 石井・黒木：工業用水，2000，505，33 - 42 .
- [7] 堀切・藤田・小林・黒木・榎並：第54回質量分析総合
討論会講演要旨集，2006，458 - 459 .