

技術報告

段階溶出法を用いた単一カラムイオンクロマト グラフィーにおける差クロマトグラム法の効果

綿谷敏彦[®], 早川和一, 能村京子, 宮崎元一*

(1994年5月17日受理)

カラムに対する保持が著しく異なる試料の一斉分析に段階溶出法は有用であるが、単一カラムイオンクロマトグラフィー (単一カラム IC) ではバックグラウンドが大きく変動するために導入が困難とされてきた。そこで著者らは、差クロマトグラム法 (ブランク試料注入時と実試料注入時のクロマトグラムをデータ処理器に記憶させ、両者の差を演算する方法) の適用により単一カラム IC においてもその導入を可能とした。間接吸光度検出 IC で無機陽イオン分析、並びに有機酸及び無機陰イオン分析を行ったところ、いずれも短時間に、かつアイソクラティック溶出時と同等の検出下限で再現性良い結果が得られた。また電気伝導度検出 IC においても間接吸光度検出 IC と同様に適用可能であった。

1 緒 言

単一カラムイオンクロマトグラフィー (単一カラム IC) はサプレッサーを必要としない比較的簡単な装置で種々のイオンが分離分析できる。これまでは専らアイソクラティック溶出条件が用いられており、保持の著しく異なる複数のイオン成分の迅速分析を目的とした濃度こう配溶出法や段階溶出法は、バックグラウンド吸光度や電気伝導度を大きく変化させるため導入は困難と考えられてきた。

この解決法としてバックグラウンド吸光度や電気伝導度変化の補正剤 (吸光成分や電解質) を添加する方法¹⁾、吸光度が等しく溶出力の異なる2種の溶離液を切り換える方法²⁾が報告されているが、使用できる分析カラムや溶離剤の種類が限られている。

一方データ処理器には、記憶させたブランク (蒸留水や溶離液) 試料のクロマトグラムを実試料のクロマトグラムから差し引く減算 (差クロマトグラム) 機能を有するものがある。この機能はこれまで GC の昇温分析等のようにベースラインレベルが変動する場合に利用されてきたが、その変動幅が非常に大きいことが予想される単一カラム IC における濃度こう配溶出や段階溶出に適用した報告はない。

著者らは、一、二価無機陽イオンの同時分析、一〜三

価有機酸及び無機陰イオンの同時分析を対象として、差クロマトグラム法の適用により単一カラム IC においても段階溶出法の導入が可能であることを明らかにしたので報告する。

2 理 論

試料を注入してからある時間 (t) 後のカラム溶出液中の溶離剤イオン濃度、試料イオン濃度をそれぞれ $E(t)$, $S(t)$ 、検出器に対する溶離剤イオン、試料イオンの感度係数をそれぞれ d_c , d_s 、装置にかかわる定数を k とおくと、ブランク (蒸留水や溶離液) のみを注入してからある時間 (t) 後の検出器応答 ($R_A(t)$) は、

$$R_A(t) = kd_c E(t)$$

と表される。一方試料を注入したカラム溶出液の検出器応答 ($R_B(t)$) は、

$$R_B(t) = k[d_c \{E(t) - S(t)\} + d_s S(t)]$$

と表される。従って両応答の差は、

$$R_B(t) - R_A(t) = k(d_s - d_c)S(t) \quad (1)$$

と表される。式(1)は $E(t)$ を含まないことより、差クロマトグラム上に現れる試料イオンのピークの大きさは溶離液の濃度変化には依存せず、試料イオン及び溶離剤イオンの感度係数の差と試料イオン成分の濃度に比例する。

* 金沢大学薬学部衛生化学教室: 920 石川県金沢市宝町 13-1

Fig. 1 に単一カラム IC における差クロマトグラム法の原理を模式的に示す。Fig. 1 (A) はブランクを注入したときのクロマトグラムを示す。ベースラインの変動は溶離液濃度の切り換えに伴うものである。Fig. 1 (B) は、4 種の試料イオン成分 (1, 2 はカラムに対する保持の弱いイオン種, 3, 4 は保持の強いイオン種) を含む試料を注入したときのクロマトグラムであるが、ベースライン変動幅に比較して 1~4 のピーク高さは極めて小さい。Fig. 1 (C) は両者の差 ((B)-(A)) をとり、かつ増幅 (データ処理機の感度を上げる) を行ったクロマトグラムである。減算により大きなベースライン変動が消去され、かつ増幅により微小な試料イオンピーク高さが拡大されている。

3 実 験

3・1 HPLCシステム

Fig. 2 に段階溶出/IC システムの流路図を示す。送液ポンプ 2 台 (P1, P2; 島津 LC-10AD), 高圧流路切り換えバルブ (V; 島津 FCV-12AH), 紫外吸光度検出器 (D; 島津 SPD-10A) 又は電気伝導度検出器 (D; 島津 CDD-6A), システムコントローラー (S; 島津 SCL-10A), 試料注入器 (I; レオダイン 7161 型, 20 μ l), データ処理器 (IT; 島津 クロマトパック C-R7A) で構成した。分析カラム (C) には、無機陽イオン分析の場合は三菱化成 MCI GEL SCK-01 (100 mm \times 4.6 mm i.d.), 有機酸及び無機陰イオン分析の場合は島津 Shim-pack IC-A3 (150 mm \times 4.6 mm i.d.) を用い、後者の場合は分析カラムをカラムオープン (島津 HIC-6A) で 40°C に保った。低濃度溶離液 (E1) と高濃度溶離液 (E2) の切り換えは、高圧流路切り換えバルブで行った (実線 \leftrightarrow 破線)。流量はいずれも 1.0 ml/min に定め、その他の条件は本文中に示した。検出器出力はデータ処理器に記憶させ、演算処理後のクロマトグラム (差クロマトグラム) を得た。

3・2 溶離液及び標準試料溶液の調製

無機陽イオン分析用溶離液には硫酸銅(II) (関東化学製, 特級) を用い、有機酸及び無機陰イオン分析用溶離液にはフタル酸二ナトリウム又はフタル酸水素ナトリウム (ナカライテスク製, 特級) を必要に応じて水酸化ナトリウム溶液で pH 調整をして用いた。それぞれ 100 mM 溶液を調製し適宜使用濃度に希釈し、孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで吸引濾過して用いた。無機陽イオン分析用標準試料溶液はいずれも市販特級の塩化物を用い、有機酸及び無機陰イオン分析用標準試料溶液は

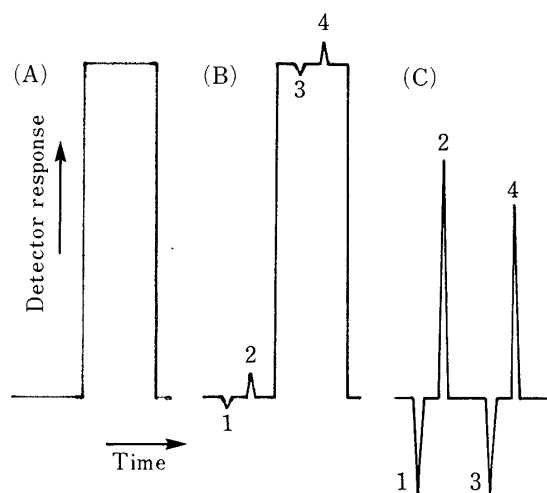


Fig. 1 Principle of differential chromatogram method in single column ion chromatography

(A): blank chromatogram; (B): sample chromatogram; (C): differential chromatogram obtained by subtracting (A) from (B) and amplifying.

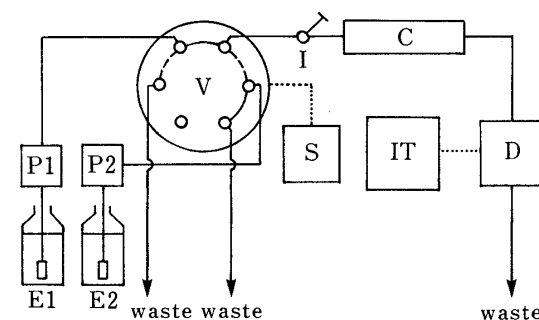


Fig. 2 Schematic diagram of stepwise elution/single column ion chromatography

Abbreviations, as in text

いずれも市販特級のナトリウム塩又はアンモニウム塩を用いた。又、溶液調製には超純水製造装置 (Mill-Q II) で精製した水を用いた。

4 結果及び考察

4・1 無機陽イオン分析

二、三のシリカ系強陽イオン交換体を充てんしたカラム³⁾に比較して、一般にアルカリ及びアルカリ土類金属イオン等の陽イオン分析用として普及しているポリスチレンジビニルベンゼン共重合体基剤にスルホン基を結合した充てん剤のカラムは、一、二価無機陽イオンの保持比 (k') の差が著しく大きい³⁾。このため、これらの

一、二価無機陽イオンの迅速一斉分析ができないという難点がある。MCI GEL SCK-01 カラムを用いたときの間接吸光度検出 IC には用される硫酸銅(II)溶液(CuSO_4)の濃度と無機陽イオン(Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+})の保持時間の関係は次のようであった。① CuSO_4 濃度が 0.01 mM のとき, Na^+ と K^+ は 5 分以内に分離溶出されたが, Mg^{2+} と Ca^{2+} は短時間では溶出されず, 溶出は 10 時間以上を要すると計算された。② CuSO_4 濃度が 3.0 mM のとき, Mg^{2+} と Ca^{2+} は 5 分以内に分離溶出されたが, Na^+ と K^+ は溶媒先端と重なって分離されずに溶出された。そこで CuSO_4 初濃度を 0.01 mM とし, 高圧流路切り換えバルブにより試料注入 5 分後に 0.01 mM から 3.0 mM に, 10 分後に再び 0.01 mM に切り換えた。この間 3.0 mM CuSO_4 の吸光度を 1 より小さくなるように検出波長を 230 nm に定めて(このときの吸光度 0.84), 検出器出力をデータ処理器に記憶させた。Fig. 3 (A) には 4 種の無機陽イオンを含む試料を注入したときのクロマトグラム(1.024 吸光度フルスケール)を示すが, いずれの無機陽イオンピークも確認できない。Fig. 3 (B) には別に記憶した蒸留水を注入したときのクロマトグラムとの差クロマトグラム(0 分から 5.7 分まで, 2×10^{-3} 吸光度フルスケール, それ以後, 8×10^{-3} 吸光度フルスケール)を示すが, CuSO_4 濃度変化に伴う約 300 倍の吸光度増にもかかわらず比較的安定したベースライン上に 4 種のイオンピークがすべて検出できた。Table 1 に各試料イオンのピーク高さ法による検出下限, 定量範囲(相関係数), 相対標準偏差を示す。まず検出下限値は, 0.01 mM 並びに 3.0 mM CuSO_4 をアインクラティック条件で用いたときのそれぞれ Na^+ , K^+ 並びに Mg^{2+} , Ca^{2+} の検出下限値と同じであった。次に, 試料イオン濃度とピーク高さの関係を見ると, いずれも相関係数 0.996 以上が得られた。このように段階溶出法を導入しても検出下限や定量性には変化がないことが明らかになった。ここで, 定量範囲の上限が二価無機陽イオンと比較して一価無機陽イオンで 2 けた低い理由は, 同一の分析カラムでも保持の弱い一価無機陽イオンは理論段数が小さく特に試料濃度が 0.2 mM を超えるとピーク幅が広がるためと考えられる。試料濃度が 0.05 mM (Na^+ , K^+), 及び 0.2 mM (Mg^{2+} , Ca^{2+}) のときの相対標準偏差は 2~5% 以内であり, 本法で定量分析が十分可能なことを示している。

4・2 有機酸及び無機陰イオン分析

間接吸光度検出 IC では, 溶離液 pH を中性付近に定

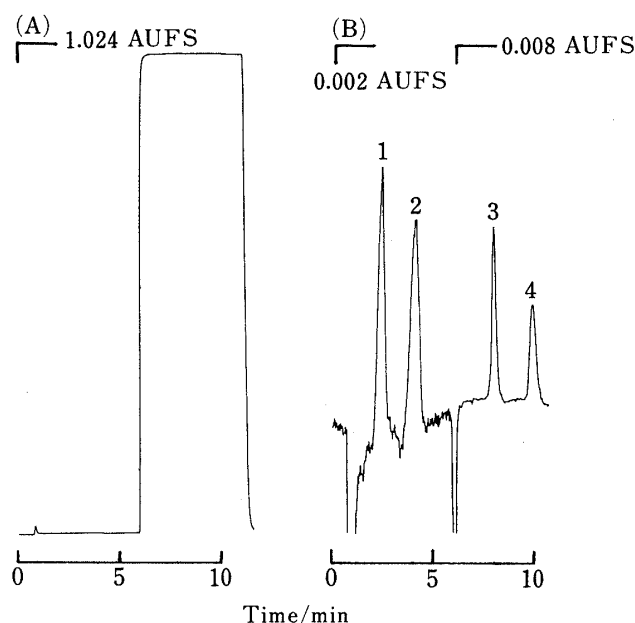


Fig. 3 Differential chromatogram of inorganic cations

Chromatogram: (A) sample chromatogram; (B) differential chromatogram obtained by subtracting blank chromatogram from sample chromatogram after amplifying and changing polarity. Eluent: CuSO_4 ; 0.01 mM(0~5 min)→3.0 mM(5~10 min)→0.01 mM(10 min~). Peaks: 1, Na^+ (0.05 mM); 2, K^+ (0.05 mM); 3, Mg^{2+} (0.2 mM); 4, Ca^{2+} (0.2 mM).

Table 1 Detection limits, quantitative ranges and RSDs^{a)}

Cation	Detection limit ^{b)} /mM	Quantitative range/mM (Correlation coefficient)	RSD, %
Na^+	0.01	0.01~0.2(0.996)	2.1
K^+	0.01	0.02~0.2(0.997)	2.9
Mg^{2+}	0.02	0.02~20(0.999)	2.3
Ca^{2+}	0.02	0.02~20(0.999)	4.7

a) RSDs, relative standard deviations; b) signal/noise=3

めることにより有機酸と無機陰イオンの一斉分析が可能である⁴⁾。第四級アンモニウム基を交換基としたポリアクリレート樹脂を充てんした Shim-pack IC-A3 カラムを用いたときのフタル酸二ナトリウム溶液(pH 7.0)の濃度と一価有機酸(乳酸, 酢酸, プロピオン酸, ギ酸)イオン, 一価無機陰イオン(塩化物イオン, 亜硝酸イオン, 臭化物イオン, 硝酸イオン, ヨウ化物イオン), 二

価無機陰イオン（硫酸イオン，チオ硫酸イオン）及び三価有機酸（クエン酸）イオンの保持時間の関係調べたところ，フタル酸二ナトリウム濃度が 0.3 mM のとき，一価有機酸及び一価無機陰イオン（ヨウ化物イオンを除く）は 20 分以内に分離溶出されたが，ヨウ化物イオン及び二価無機陰イオンの溶出には 30 分以上，保持が最も強いクエン酸は 4 時間以上を要した．フタル酸二ナトリウム濃度を 1.5 mM にすると，クエン酸は 25 分で溶出したが，一価有機酸の分離が不十分であった．そこでフタル酸二ナトリウム初濃度を 0.3 mM とし，高压流路切り換えバルブにより試料注入 20 分後に 0.3 mM から 1.5 mM に，50 分後に再び 0.3 mM に切り換えた．この間検出波長を 270 nm に定め（このとき 0.3 mM 及び 1.5 mM フタル酸二ナトリウムの吸光度は，それぞれ 0.19 及び 0.95），検出器出力をデータ処理器に記憶させた．Fig. 4 には 12 種の有機酸及び無機陰イオンを含む試料の差クロマトグラム（0 分から 22 分まで 8.0×10^{-3} 吸光度フルスケール，それ以後 3.2×10^{-2} 吸光度フルスケール）を示すが，比較的安定したベースライン上に 12 種のイオンピークがすべて検出できた．Table 2 に各試料イオンのピーク高さ法による検出下限，定量範囲（相関係数），相対標準偏差を示す．検出下限値は一，二価無機陰イオンと有機酸は 0.002 mM から 0.03 mM の範囲にあり，最も溶出の遅いクエン酸でも 0.08 mM であった．これらの値はいずれもアインクラティック溶出条件で得られた値と同じであった．次に試料イオン濃度とピーク高さの相関係数は，いずれも 0.996 以上であった．一価有機酸イオンの定量範囲の上限が他のイオンに比較して低い理由は，試料イオン濃度が 0.5 mM 以上になるとシグナルレベルがデータ処理器の測定可能電圧範囲を超えるためである．それぞれの試料イオン濃度が 0.1 mM から 0.5 mM の範囲で，定量値の相対標準偏差はいずれも 5% 以内であった．以上の結果は差クロマトグラム法により，段階溶出法を導入した定量分析が十分可能なことを示している．

4・3 連続分析におけるベースライン変動

Fig. 3 (B) の 6 分付近，あるいは Fig. 4 の 22 分付近を境にわずかなベースライン段差が見られた．この段差は高濃度溶離液の吸光度が温度変化によりわずかながら経時変化することに由来するが，これが大きくなると長時間の連続分析は困難になる．そこでこの吸光度変化量を継続して記録したところ，8 時間連続分析で 0.01 吸光度以下であった．この結果から，ベースラインに大き

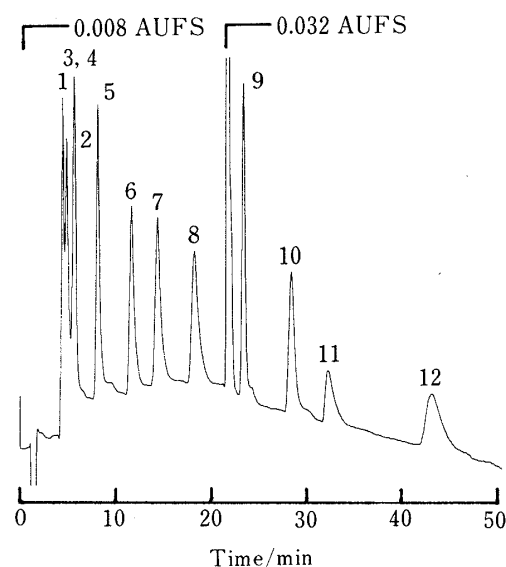


Fig. 4 Differential chromatogram of carboxylates and inorganic anions after changing polarity

Eluent: disodium phthalate (pH 7); 0.3 mM (0~20 min) → 1.5 mM (20~50 min) → 0.3 mM (50 min~) Peaks: 1, lactate(0.2 mM); 2, acetate(0.2 mM); 3, propionate(0.2 mM); 4, formate(0.2 mM); 5, Cl^- (0.2 mM); 6, NO_2^- (0.2 mM); 7, Br^- (0.2 mM); 8, NO_3^- (0.2 mM); 9, SO_4^{2-} (0.5 mM); 10, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (0.5 mM); 11, I^- (0.5 mM); 12, citrate(0.5 mM).

Table 2 Detection limits, quantitative ranges and RSDs^{a)}

Anion	Detection limit ^{b)} /mM	Quantitative range/mM (Correlation coefficient)	RSD, %
Lactate	0.002	0.01~0.2(0.996)	4.7
Acetate	0.002	0.01~0.2(0.998)	2.3
Propionate	0.002	0.01~0.2(0.999)	2.0
Formate	0.002	0.01~0.2(0.999)	2.0
Cl^-	0.002	0.01~0.5(0.997)	3.4
NO_2^-	0.004	0.01~0.5(0.998)	3.0
Br^-	0.004	0.01~0.5(0.998)	3.8
NO_3^-	0.01	0.01~0.5(0.999)	2.7
SO_4^{2-}	0.01	0.01~2.0(0.999)	4.0
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	0.02	0.02~2.0(0.998)	4.3
I^-	0.03	0.05~2.0(0.998)	2.5
Citrate	0.08	0.1~2.0(0.999)	3.6

a) RSDs, relative standard deviations; b) signal/noise=3

なうねりを生ずるような妨害成分を試料中に含んでいなければ，蒸留水や溶離液を注入したときのクロマトグラ

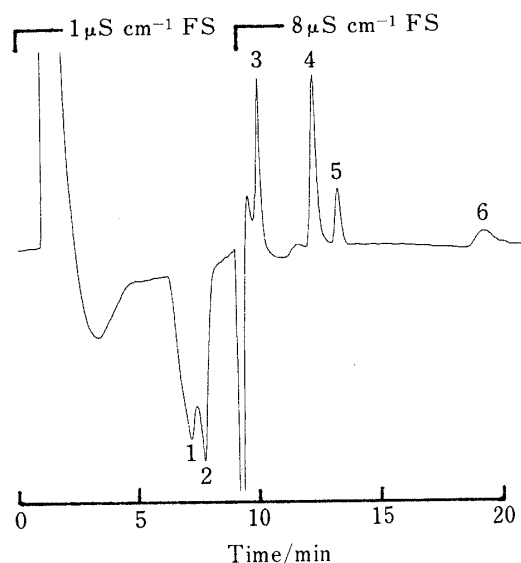


Fig. 5 Chromatogram of carboxylates and inorganic anions using conductivity detector

Eluent: sodium hydrogenphthalate (pH 6.5); 0.1 mM (0~8 min) → 2.0 mM (8~20 min) → 0.1 mM (20 min~). Peaks: 1, lactate (0.1 mM); 2, acetate (0.1 mM); 3, Cl⁻ (0.1 mM); 4, SO₄²⁻ (0.1 mM); 5, NO₃⁻ (0.1 mM); 6, citrate (0.1 mM)

ムデータを1回記憶させるだけで、長時間にわたって実際試料を連続注入分析できると考えられる。

4・4 電気伝導度検出による分析

Fig. 5 に有機酸及び無機陰イオンを電気伝導度検出によって分析したクロマトグラムを示す。間接吸光度検出による分析と同様、ブランク試料のクロマトグラムを実試料のクロマトグラムから差し引いたところ、比較的安定したベースライン上に 0.1 mM レベルの 6 種試料(乳酸, 酢酸, 塩化物, 硝酸, 硫酸, クエン酸)イオンピークがすべて検出できた。各試料イオンのピーク高さ法による検出下限, 定量範囲(相関係数)を Table 3 に示す。検出下限値は 0.006 mM から 0.03 mM の範囲に

Table 3 Detection limits, quantitative ranges and RSDs^{a)}

Anion	Detection limit ^{b)} /mM	Quantitative range/mM (Correlation coefficient)	RSD, %
Lactate	0.008	0.02~0.3(0.999)	1.9
Acetate	0.008	0.02~0.2(0.999)	3.6
Cl ⁻	0.01	0.01~1.0(0.998)	5.0
SO ₄ ²⁻	0.01	0.01~1.0(0.998)	5.3
NO ₃ ⁻	0.006	0.01~1.0(0.999)	5.5
Citrate	0.03	0.05~1.0(0.998)	5.8

a) RSDs, relative standard deviations; b) signal/noise=3

ありこれらの値はいずれもアイソクラティック溶出条件で得られた値と同じであった。次に試料イオン濃度とピーク高さの相関係数は、いずれも 0.998 以上であった。それぞれのイオン濃度が 0.1 mM のとき、定量値の相対標準偏差は 2~6% 以内であった。

以上のようにカラムに対する保持が大きく異なる複数のイオンを段階溶出し、生じる大きなベースライン上昇を差クロマトグラム法で消去し、かつ微小試料ピーク強度を増幅できる本法は、単一カラム IC における陽イオン分析及び陰イオン分析のいずれにも適用が可能である。又、検出法は吸光度検出法及び電気伝導度検出法のいずれも適用が可能である。

(1993年5月, 日本分析化学会第10回イオンクロマトグラフィー討論会において一部発表)

文 献

- 1) W. R. Jones, P. Jandik, A. L. Heckenberg: *Anal. Chem.*, **60**, 1977 (1988).
- 2) 山本 敦, 松永昭信, 牧野正雄, 早川和一, 宮崎元一: *衛生化学*, **32**, 174 (1987).
- 3) M. Miyazaki, K. Hayakawa, S. Choi: *J. Chromatogr.*, **323**, 443 (1985).
- 4) 吉田育代, 早川和一, 宮崎元一: *衛生化学*, **31**, 317 (1985).

☆

Effectiveness of differential chromatogram method in single column ion chromatography using stepwise elution. Toshihiko WATAYA, Kazuichi HAYAKAWA, Kyoko NOMURA and Motoichi MIYAZAKI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920)

The differential chromatogram method was useful to reduce large changes in background response in single column ion chromatography using stepwise elution. Cations

(Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺) were separated on a cation exchange column by stepwise elution using both 0.01 mM and 3.0 mM copper sulfate eluents and detected at 230 nm by indirect photometry. Anions (lactate, acetate, propionate, formate, citrate, Cl⁻, NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻ and I⁻) were separated on an anion exchange column using both 0.3 mM and 1.5 mM disodium phthalate eluents and detected at 270 nm. This method was also successfully applied to conductometric detection.

(Received May 17, 1994)

Keyword phrases

differential chromatogram method; stepwise elution method; single column ion chromatography.
