

陰イオンのイオンクロマトグラフィーにおける吸光度検出法と電気伝導度検出法の特徴と比較

中村誠治, 今泉範子, 早川和一[®], 宮崎元一*

(1989年6月16日受理)

ノンサプレッサー型イオンクロマトグラフィー(IC)としては用いられる電気伝導度検出ICと間接吸光度検出ICの感度特性を検出原理式に基づき、強酸性物質と弱酸性物質について比較した。両法に用いることができる溶離液種として安息香酸及びフタル酸を用いると、硝酸イオンなどの強酸性物質の検出では、低pH溶離液の電気伝導度検出のほうが感度が高く、弱酸性物質の検出では、高pH溶離液の間接吸光度検出のほうが高かった。共通溶離液としては用いられる低pHのフタル酸溶離液を用いたときの両者による強酸性物質の分析値の相関は良かった。又、溶離液として、1,5-ナフタレンジスルホン酸やベンゼンジスルホン酸を用いると、間接吸光度検出による感度を向上させることができ、強酸性物質の検出でも低pHフタル酸溶離液を用いたときの感度を上回った。

1 緒言

多くのイオン性物質を同時に分析できるイオンクロマトグラフィー(IC)¹⁾の出現は、イオン種ごとに異なる方法を用いていた従来の分析を一変し、今やJISや衛生試験法などの公定法に次々に収載されるすう勢になっている。初期のICは、サプレッサー型の電気伝導度検出方式のみであったが、後にノンサプレッサー型が開発され²⁾、更に、ノンサプレッサー型で、かつ光吸収のない試料イオンの分離溶出を光吸収の大きな溶離液イオンの減少として検出する間接吸光度検出方式も開発された³⁾。現在、これらの異なる方式のICが日常的に用いられている。

以上の方式の中でノンサプレッサー型は、電気伝導度検出と間接吸光度検出のいずれの方式でも比較的簡単な装置構成で行えるという特徴がある。しかも両者は、芳香族カルボン酸、例えばフタル酸のような共通の溶離液を用いることができ、併用すると利点があることも報告されている⁴⁾。しかしこの両者は、検出原理が全く異なるために、分析対象によって最適条件も異なる。従って、個々の検出方式のICを有効に使用し、あるいは併用するためには、それぞれの特性を十分に理解する必要がある。これらのうち、著者らが実用化を進めてきた後者⁵⁾は、強酸性物質と弱酸性物質⁶⁾や陰イオンと金属イ

オンの同時分析⁷⁾ができるなどの点で優れているが、研究の歴史が新しいために、特性が十分に把握されないままに使用されている場合もあり、電気伝導度検出との比較研究も少ない⁸⁾⁹⁾。

本報告では、イオン交換モードを用いた陰イオン性物質の分析を対象に、共通溶離液を用いて両検出法を比較し、特性の違いと相関性を明らかにした。更にその結果に基づき、間接吸光度検出ICの高感度化のための溶離液についても併せて検討した。

2 検出原理式

通常の吸光度検出液体クロマトグラフィーでは、移動相組成の変化によって、溶出時間が異なりピーク高さは変化するが、ピーク面積は変化しないことはよく知られている。そこで、異なる組成の溶離液同士でも比較を行う本研究目的には、ピーク面積を用いることにした。

まず電気伝導度検出法(CD)では、陰イオン交換カラムからの試料の溶出に伴う電気伝導度変化総量(A_{CD})は、解離(イオン)成分のみに依存して式(1)で与えられる⁹⁾。ここで λ_c^+ 、 λ_c^- はそれぞれ溶離液(一価)陽イオン及び陰イオンの限界当量伝導度、 λ_s^- は試料陰イオンの限界当量伝導度、 C_s は試料濃度、 I_s 、 I_c はそれぞれ溶離液成分及び試料成分のイオン化の割合、 Q_s は試料注入量を表す。

* 金沢大学薬学部: 920 石川県金沢市宝町 13-1

$$A_{CD} = \int [(\lambda_e^+ + \lambda_s^-) - (\lambda_e^+ + \lambda_e^-)I_e] C_s I_s dt \\ = |(\lambda_e^+ + \lambda_s^-) - (\lambda_e^+ + \lambda_e^-)I_e| Q_s I_s \dots\dots\dots (1)$$

一方、ノイズの大きさ (N_{CD}) は、 X を溶離液組成に無関係に現れるノイズ、 J を装置に係る定数とすると式(2)で表される。

$$N_{CD} = J(\lambda_e^+ + \lambda_e^-)C_e I_e + X \dots\dots\dots (2)$$

いまカラムの理論段数を一定とすると、ピーク高さはピーク面積に比例するので、感度の指標となるピーク高さとノイズの比はピーク面積とノイズの比として表される。すなわち、 N_{CD}/A_{CD} (この値の絶対値が小さいほど感度は良い) は式(1)及び(2)より次のように表される。

$$\frac{N_{CD}}{A_{CD}} = \frac{J(\lambda_e^+ + \lambda_e^-)C_e I_e + X}{|(\lambda_e^+ + \lambda_s^-) - (\lambda_e^+ + \lambda_e^-)I_e| Q_s I_s} \quad (3)$$

次に、間接吸光度検出法 (IPD) による吸光度変化の総量 (A_{IPD}) は解離及び非解離成分に依存して式(4)で与えられる。ここで ϵ_e , ϵ_e^- はそれぞれ溶離液成分の非解離型及び解離 (イオン) 型の単位濃度当たりの吸光度、 ϵ_s , ϵ_s^- はそれぞれ試料成分の非解離型及び解離型の単位濃度当たりの吸光度である。

$$A_{IPD} = \int [|\epsilon_s + (\epsilon_s^- - \epsilon_s)I_s| C_s \\ - |\epsilon_e + (\epsilon_e^- - \epsilon_e)I_e| C_s I_s] dt \\ = |\epsilon_s + (\epsilon_s^- - \epsilon_s)I_s| Q_s \\ - \epsilon_e + (\epsilon_e^- - \epsilon_e)I_e| Q_s I_s \dots\dots\dots (4)$$

試料成分に光吸収がないと、式(4)は次のようになる。

$$A_{IPD} = -|\epsilon_e + (\epsilon_e^- - \epsilon_e)I_e| Q_s I_s \dots\dots\dots (5)$$

一方、ノイズの大きさ (N_{IPD}) は、 Y を溶離液組成に無関係に現れるノイズ、 K を装置に係る定数とすると式(6)で表される。

$$N_{IPD} = K|\epsilon_e + (\epsilon_e^- - \epsilon_e)I_e| C_e + Y \dots\dots\dots (6)$$

N_{IPD}/A_{IPD} は、式(5)及び(6)より次のように表される。

$$\frac{N_{IPD}}{A_{IPD}} = \frac{K|\epsilon_e + (\epsilon_e^- - \epsilon_e)I_e| C_e + Y}{|\epsilon_e + (\epsilon_e^- - \epsilon_e)I_e| Q_s I_s} \dots\dots\dots (7)$$

3 実 験

3.1 装 置

IC システムは、送液ポンプ (島津 HIC-6A)、オートサンプラー (協和精密 KMT-30A-II, ループ容量 20 μ l), カラムオープン (島津 CTO-6AS), 電気伝導度検

出器 (島津 CDD-6A), 波長可変紫外可視吸光度検出器 (島津 SPD-6AV) 及びインテグレーター (島津 C-R3A) 又はペンレコーダーで構成した。ガードカラム及び分析カラムには、それぞれ島津 Shim-pack IC-GA1 (4.6 mm i.d. \times 10 mm), Shim-pack IC-A1 (4.6 mm i.d. \times 100 mm) を用いた。両カラムは 40°C に、電気伝導度検出セルは 43°C に保った。溶離液の流量は、1.5 ml/min とした。又システムは、あらかじめ検討する溶離液を一晩流してコンディショニングした。なお、空気中から溶離液に混入して測定を妨害する二酸化炭素の影響を除去するために、溶離液には常時窒素を 50~60 ml/min で流してバブリングした¹⁰⁾。

3.2 試液調製

溶離液用の安息香酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、ベンゼンジスルホン酸及び 1,5-ナフタレンジスルホン酸はいずれも和光純薬工業製特級を、その他の試薬も市販特級品を購入して使用した。試液調製の水は、イオン交換蒸留水を更にミリポア Milli Q-II で処理してから使用した。溶離液 pH は、水酸化ナトリウムあるいはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを用いて調製した。調製後の溶離液はメンブランフィルター (富士 FR-45, 孔径 0.45 μ m) で濾過してから使用した。

4 結果及び考察

4.1 溶離液の pH と検出感度

Table 1 には、CD に主として使用される低 pH (4.3), 及び IPD に主として使用される高 pH (6.7) に調製した安息香酸とフタル酸溶液を溶離液としたときの N/A 値を比較した。溶離液種が異なっても保持時間が近似するように、安息香酸の濃度はフタル酸の 5 倍とし、IPD の測定波長はいずれの溶離液の吸光度も 1 付近になるように定めた。又、Table には、pH 6.7 のフタル酸溶離液を用いたときの IPD による硝酸イオンの N/A 値の相対値で示したが、このとき、硝酸イオンの検出下限はシグナル/ノイズ比を 3 とすると、 2×10^{-11} mol であった。まず安息香酸 (pK_a 4.2) は、 I_e が pH 4.3 では 0.56, pH 6.7 では 1.0 の弱酸であり、強酸性陰イオンである硝酸イオンでは、CD による N_{CD}/A_{CD} は pH 6.7 が pH 4.3 の 4 倍大きい (低感度) のに対して、IPD ではほとんど差がなかった。同様の結果は、フタル酸溶離液についても観察された。この違いは、CD で強酸性陰イオン ($I_s=1$) を検出する場合、バックグラウンド電気伝導度を低く押さえる低 pH のほうが感度が向上するが、これに対して IPD では、式(7)の Y が

Table 1 Relative detection sensitivities of anions with benzoate and phthalate as eluents

Analyte	Method	$N/A^{a)}$	
		pH 4.3	pH 6.7
Eluent: 1.0×10^{-3} M benzoate			
Nitrate	CD	0.8	3.2
	IPD ^{b)}	-4.4	-4.0
Propionate	CD	1.6	ND ^{d)}
	IPD ^{b)}	ND ^{d)}	4.0
Eluent: 2.0×10^{-4} M phthalate			
Nitrate	CD	0.4	3.3
	IPD ^{c)}	-1.0	-1
Propionate	CD	1.5	-2.8
	IPD ^{c)}	-4.8	-1.0

a) relative value to the value of nitrate by IPD with 2.0×10^{-4} M phthalate at pH 6.7; b) detected at 255 nm; c) detected at 247 nm; d) not detected

十分小さいと,

$$N_{IPD} / A_{IPD} \cong -KC_e / Q_s I_s \dots \dots \dots (8)$$

となり, 感度はほとんど溶離液成分の解離 (I_c) には依存しなくなるためと考えられる. 式(8)は Small らの提案式³⁾ に一致する.

次に, 弱酸であるプロピオン酸 (pK_a 4.9) についてみると, pH 4.3 の安息香酸溶離液で CD による N_{CD}/A_{CD} ($=1.5$) は硝酸イオンの 2 倍であり, pH 6.7 では検出されない. これに対して IPD によるプロピオン酸の N_{IPD}/A_{IPD} は, その pK_a より低い pH 4.3 ではピークが小さすぎて測定値が得られなかったが, pH 6.7 にすると硝酸イオンと同等の値となった. フタル酸溶離液を用いるとその違いが更に顕著になった. すなわち, CD では, pH 4.3 でのプロピオン酸の N_{CD}/A_{CD} ($=1.5$) は硝酸イオンの 3.8 倍であり, pH 6.7 では反転ピーク (電気伝導度の減少) として検出された. これに対して IPD によるプロピオン酸の $|N_{IPD}/A_{IPD}|$ は, pH 6.7 では pH 4.3 の値に比較して $1/4.8$ となり, 感度の向上が認められた. 式(7)より, IPD の感度は試料成分の解離の割合 (I_c) に依存するので, 溶離液 pH を上昇させるとプロピオン酸のような弱酸の感度は向上する.

強酸性陰イオンを低 pH 溶離液で CD により検出する場合, 式(1)から $(\lambda_c^+ + \lambda_s^-) > (\lambda_c^+ + \lambda_e^-)$ であり正ピークになる. しかし, 当量電気伝導度が小さい弱酸を検出する場合, pH があるいき値を越えると $(\lambda_c^+ + \lambda_s^-) < (\lambda_c^+ + \lambda_e^-)$ となり, 負ピークになる場合があ

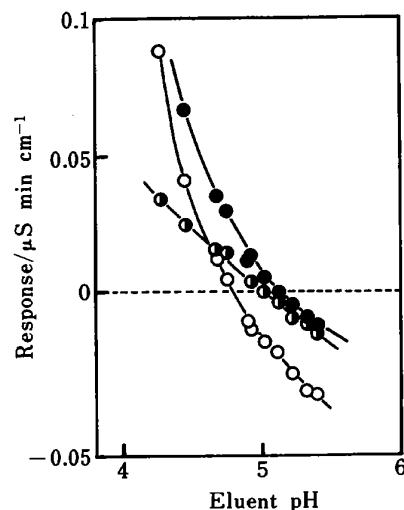


Fig. 1 Plots of peak direction and area of gluconate, propionate and pyruvate as a function of pH of 2.0×10^{-4} M phthalate

The eluent pH was adjusted with tris(hydroxymethyl)aminomethane. (○) gluconate; (◐) propionate; (●) pyruvate

る. Fig. 1 には例としてグルコン酸 (pK_a 3.6), プロピオン酸及びピルビン酸 (pK_a 2.5) のピークの方向 (電気伝導度の増加減少) と面積をフタル酸溶離液の pH に対してプロットした. いずれも低 pH では正のピークであるが, pH の上昇に伴いピーク面積は減少し, pH 5 付近を超えると負ピークとなった. この pH 値は当量電気伝導度及び解離の割合の関数であるので, 使用する溶離液及び試料成分の種類によって異なるはずである. 一般にカルボン酸溶離液では, このようなピークの消滅反転現象が比較的低 pH で観察されることが多く, CD による弱酸の分析を妨げる原因になると推定される. 逆に, 溶離液の pH を高くするか, あるいは当量電気伝導度の大きな溶離液を用いて, 弱酸を負ピーク (電気伝導度の減少) として検出する試みも報告されている¹¹⁾.

以上から芳香族カルボン酸を溶離液として用いるとき, 強酸性物質の分析には, 溶離液 pH を低くして CD で検出すると感度が高く, 弱酸性物質の分析には, 溶離液 pH を高くして IPD で検出すると, ピークの消滅や反転がなく感度も高い.

4.2 分析値のばらつきと関連

IC がはん用される対象として環境水中の無機イオン分析がある. そこで, フタル酸溶離液の pH を 4.3 に定めて塩化物イオン, 硝酸イオン及び硫酸イオン (いずれ

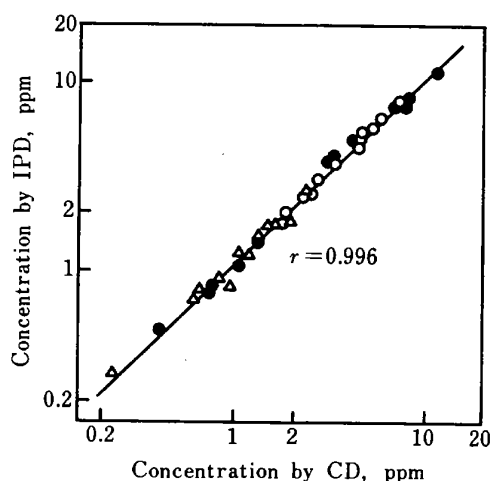


Fig. 2 Correlations of chloride, nitrate and sulfate concentrations in soluble fractions of monthly collected deposits

(●) Cl^- ; (Δ) NO_3^- ; (○) SO_4^{2-}

も 1 ppm と 5 ppm) を CD と IPD の両法で 5 回ずつ注入してピーク高さを測定した。その結果、いずれの検出法でもすべてのイオン種と濃度について、相対標準偏差は 0.3% から 0.8% の範囲にあり良好であった。一般に、温度変化に敏感な電気伝導度検出セルはオープンの中で恒温に保つものに対して、吸光度検出器は恒温設備なしで使用されることが多い。本結果は、吸光度検出器は恒温設備なしでも実用分析に十分使用できることを示している。

著者が所属する研究機関(金沢大学薬学部)の屋上で 1985 年 12 月から 1986 年 11 月までの 1 年間にわたって 1 か月ごとに採取した降下ばいじん可溶性分画に含まれる塩化物イオン、硝酸イオン及び硫酸イオンについて両法で分析し、その分析値の相関を Fig. 2 に示した。相関係数は、塩化物イオンで 0.996、硝酸イオンで 0.976、硫酸イオンで 0.996、3 成分を総合すると 0.996 といずれも良好であった。

4.3 IPD の高感度化

芳香族スルホン酸類は、紫外吸収が大きく、広い pH 範囲で解離しているため、IPDIC の溶離液として注目されている。試みに、ベンゼンスルホン酸溶離液について IPD による $N_{\text{IPD}}/A_{\text{IPD}}$ を求めると、試料成分が強酸性、弱酸性によらず、フタル酸溶離液を用いた場合より劣っていた。一般に、イオン交換クロマトグラフィーでは、一塩基酸より二塩基酸のほうが溶出力が強いことが知られているので、置換スルホン基の数を増すと、保持

Table 2 Improvement of sensitivity of indirect photometric detection by divalent aromatic sulfonates

Eluent ^{a)} (Detection wavelength/nm)	$N/A^b)$
1.0×10^{-3} M benzenesulfonate (262)	-2.6
5.0×10^{-5} M <i>m</i> -benzenedisulfonate (220)	-0.3
1.5×10^{-5} M 1,5-naphthalenedisulfonate (287)	-0.2
2.0×10^{-4} M <i>o</i> -phthalate (247)	-1.0

a) prepared with sodium or disodium salts. b) relative value to the value of bromide by IPD with 2.0×10^{-4} M *o*-phthalate at pH 6.7

時間を変えずに溶離液濃度 (C_c) を下げることができるとはならずである。しかも式(7)から、 C_c が小さいほど IPD の感度が上がることが分かる。

そこで、芳香環にスルホン基を 2 個持つ化合物を溶離液として検討したところ、スルホン基の位置の違いによる溶出力の差は小さかったが、環数が 1 個から 2 個に増えると溶出力は顕著に増強した。例として、*m*-ベンゼンスルホン酸及びナフタレンジスルホン酸のなかで検出波長 (280 nm) 付近の吸光度が最大な 1,5-ナフタレンジスルホン酸¹²⁾ を溶離液とすると、前者はフタル酸の 1/4、後者は 1/13 の濃度で同程度の溶出力を得ることができた。臭素イオンを例にとると、 $|N_{\text{IPD}}/A_{\text{IPD}}|$ はフタル酸溶離液に比べて前者は 1/3、後者は 1/5 になった。特に、1,5-ナフタレンジスルホン酸の値は、低 pH フタル酸溶離液を用いた CD の $N_{\text{CD}}/A_{\text{CD}} (=0.4)$ より小さく、強酸性陰イオンの検出でも CD を上回る感度を得られることが分かった (Table 2)。式(8)に従うならば、 $|N_{\text{IPD}}/A_{\text{IPD}}|$ は溶離液濃度 (C_c) に比例して小さくなるので、前者は 1/4、後者は 1/13 になるはずであるが、実験値はそれより大きかった。これは、異なる測定波長では式(7)の Y の値が異なり、省略できないことを示している。

Fig. 3 は、1,5-ナフタレンジスルホン酸とフタル酸を溶離液としたときの、硫酸イオン、チオ硫酸イオン及びヨウ素イオンの IPD によるクロマトグラムである。硫酸イオンの保持時間をほぼ等しくなるように溶離液濃度を調整している。両溶離液系のノイズの大きさがほぼ同程度であるのに対して、3 成分のピーク高さは 4 倍以上になった。このように、保持が強いためにフタル酸溶離液では高感度検出にくい成分も、1,5-ナフタレンジスルホン酸を用いることによって感度を向上させることができた。Table 2 の結果を踏まえると、ジスルホン酸よ

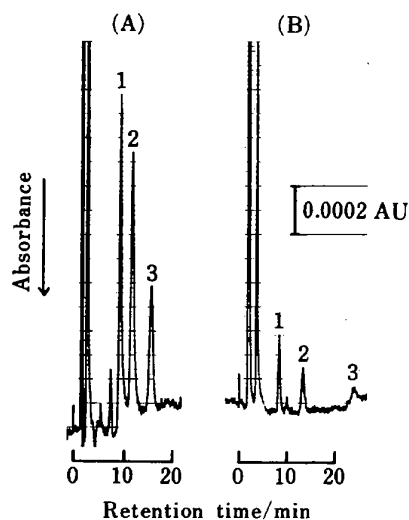


Fig. 3 Chromatograms of sulfate, thiosulfate and iodide

Peaks: 1, sulfonate; 2, thiosulfonate; 3, iodide; each 2×10^{-10} mol. (A) eluent, 1.5×10^{-5} M disodium 1,5-naphthalenedisulfonate; detection wavelength, 303 nm. (B) eluent, 1.0×10^{-3} M disodium *o*-phthalate; detection wavelength, 280 nm

り溶出力が強いと考えられるトリスルホン酸を使用すれば, 更に検出感度が向上すると予想される。

文 献

- 1) H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman: *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 2) D. T. Gjerde, J. S. Fritz: *J. Chromatogr.*, **176**, 199 (1979).
- 3) H. Small, T. E. Miller Jr.: *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 4) 西村雅之, 今道仙也, 三上 博: 第4回イオンクロマトグラフィー討論会講演要旨集, p. 32 (1987).
- 5) 宮崎元一, 早川和一: “新しいイオンクロマトグラフィーの手ほどき”, (南江堂), (1986).
- 6) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **31**, 317 (1985).
- 7) K. Hayakawa, T. Sawada, K. Shimbo, M. Miyazaki: *Anal. Chem.*, **59**, 2241 (1987).
- 8) P. R. Haddad, A. L. Heckenberg: *J. Chromatogr.*, **252**, 177 (1982).
- 9) R. C. L. Foley, P. R. Haddad: *J. Chromatogr.*, **366**, 13 (1986).
- 10) K. Hayakawa, S. Kitamoto, N. Okubo, S. Nakamura, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, in press.
- 11) T. Okada, T. Kuwamoto: *Anal. Chem.*, **55**, 1001 (1983).
- 12) 本水昌二, 弘中孝志: 第47回分析化学討論会講演要旨集, p. 193 (1987).

☆

Characteristics of photometric and conductivity detection and their comparison in ion chromatography for anionic compounds.

Seiji NAKAMURA, Noriko IMAIZUMI, Kazuichi HAYAKAWA and Motoichi MIYAZAKI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920)

The detection sensitivities of anionic compounds by conductivity detection (CD) and indirect photometric detection (IPD) were compared in non-suppressed ion chromatography. The reciprocal of peak area to noise ratio was used to compare the two detection methods for such common eluents as benzoate and phthalate at pH 4.3 and pH 6.7. The sensitivities of strong acid compounds were highest by CD at pH 4.3, while those of weak acid compounds were highest by IPD at pH 6.7. These results were consistent with theoretical equations for the two detection methods. The sensitivities of strong acid compounds by IPD exceeded those by CD with the phthalate eluent at pH 4.3, using eluent species such as 1,5-naphthalenedisulfonate. Correlations between the two methods were excellent in the determination of inorganic anions in soluble fractions of monthly collected deposits.

(Received June 16, 1989)

Keyword phrases

ion chromatography; indirect photometric detection; conductivity detection; detection sensitivity; correlation.