

技術報告

吸光度検出イオンクロマトグラフィーによる無機陰イオンの定量

——市販イオン交換体を充てんした分離カラムと

普及型高速液体クロマトグラフの活用——

早川 和一[®]，平木 博美，宮崎 元一*

(1985年1月18日受理)

入手が容易なイオン交換カラムを備えた普及型 HPLC 装置で可能な，無機陰イオンの微量分析条件を検討した．無機陰イオン（炭酸イオン，塩化物イオン，亜硝酸イオン，リン酸イオン，臭化物イオン，硝酸イオン，硫酸イオン，ヨウ化物イオン）は，フタル酸二ナトリウム溶液を溶離液として，陰イオン交換カラムで分離溶出された後，ベースラインの谷として紫外検出される．炭酸イオン，塩化物イオン，リン酸イオン，臭化物イオン，硝酸イオン，硫酸イオンの同時分析の最適条件は，カラム：Zipax SAX (2.1 mm i. d. × 50 cm)；溶離液： 5×10^{-4} M フタル酸二ナトリウム；流速：1 ml/min；温度：室温；検出波長：240 nm；注入量：100 μ l であった．この条件で，検出下限は ppb レベルであり，ピーク高さ法と面積法のいずれでも検量線は直線となった．本法を用いると，環境試料中の主要無機陰イオンが短時間に一斉分析でき，しかも本法の分析値は，他法の結果ともよく一致した．

1 緒 言

電気伝導度検出器を用いるイオンクロマトグラフィー (IC)¹⁾ は，1975 年に発明されて以来，無機イオンの分析を必要とする領域で用いられるようになってきた．その後 1982 年に，Small らは，吸光度検出器を用いる “Indirect photometric chromatography” によるイオン分析法を発表した²⁾．この原理は，イオン交換分離カラムからの光吸収がないイオンの溶出を，溶離に用いる光吸収が大きなイオン溶液の示す吸光度の減少，すなわちベースラインの谷として検出することである．この報告は，無機イオン分析が吸光度検出器付きの普及型高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置で行えることを示唆していたが，分離カラムには，特別に調製したイオン交換体を充てんしており，一般の研究者が容易に用いられる条件ではなかった．

一方著者らは，HPLC によるイオン性物質の微量分析法の開発研究の一環として，従来から市販され，一般

の研究者が容易に入手できるカラム充てん剤のなかに，上述の原理が適用でき，無機イオンの高感度分析が可能なものがあることを見いだした³⁾⁴⁾．そこで本研究では，環境水の無機陰イオンを主な分析対象として，市販充てん剤のうちで有効な Zipax SAX (Du Pont) を充てんした分離カラムと普及型 HPLC 装置を組み合わせたシステムを活用するための条件を詳細に検討した．

2 実 験

2.1 HPLC システム

システムは，送液ポンプ（応用分光機器 LC-200），試料注入器（レオダイノルーブインジェクター 7120），ステンレス製クロマト管，波長可変紫外吸光度検出器（応用分光機器 UVILOG-5HIA）及び記録計（日本電子科学 Unicorder U-228）で構成した．

2.2 試液及び分離カラムの調製

溶離液用試薬（フタル酸又はフタル酸二ナトリウム）と標準陰イオン用試薬（ナトリウム塩又はカリウム塩）は，いずれも半井化学製特級品を，その他の試薬も市販特級品を用いた．溶離液は，0.40 μ m のメンブランフィルターで濾過して使用した．又，クロマト管には，Zipax

* 金沢大学薬学部衛生化学教室：920 石川県金沢市宝町 13-1

SAX(30~40 μm , Du Pont) をスラリー法で充てんし、あらかじめ溶離液を十分に流した。

2.3 HPLC 条件

分離, 分析時間, 検出感度などを考慮したとき, 環境水に含まれることが多い6種陰イオン(炭酸イオン, 塩化物イオン, 臭化物イオン, 硝酸イオン, リン酸イオン, 硫酸イオン)の現段階の最適条件は次のとおりである(これを HPLC 条件の各項目が標準イオンの分離と検出に及ぼす影響を明らかにするための基準条件とした)。分離カラム: Zipax SAX(2.1 mm i. d. \times 50 cm); 溶離液: 5×10^{-4} M フタル酸二ナトリウム (pH 6.5 \pm 0.2); 流速: 1 ml/min; カラム温度: 室温 (22~25 $^{\circ}\text{C}$); 検出波長: 240 nm; 試料注入量: 100 μl 。以上の条件で, 記録計の入力極性を逆に接続し, 負ピーク(吸光度の減少)を上向きのピークとして記録したクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

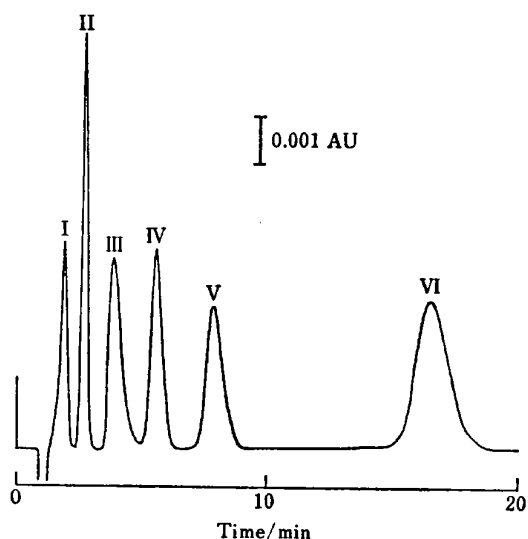


Fig. 1 Chromatogram of six anions

I: HCO_3^- (6.1 ppm); II: Cl^- (3.5 ppm); III: H_2PO_4^- (9.7 ppm); IV: Br^- (8.0 ppm); V: NO_3^- (6.2 ppm); VI: SO_4^{2-} (9.6 ppm). The conditions are described in 2.3.

3 結果及び考察

3.1 分離カラム

Fig. 1 の6種標準イオンが ppm 以下のレベルで 20 分以内に分離分析できるカラム充てん剤を検索すると, シリカ基材のペリキュラー型低イオン交換容量(著者らの検討では 0.005~0.01 meq/g)陰イオン交換体である Zipax SAX が適当であった。これ以外の従来から市販されている充てん剤 3 種 (TSK-GEL IEX-220; Zorbax SAX; 日立ゲル # 3013-N) についても検討した

が, いずれもイオン交換容量が大きすぎ, 標準イオンの溶出が遅く不適切であった。更に, Zipax SAX を (1) 2.1 mm i. d. \times 50 cm, (2) 4.6 mm i. d. \times 15 cm, (3) 4.6 mm i. d. \times 25 cm の異なるサイズのカラムに充てんすると, カラム効率は (1) と (3) が良く, 充てん剤量が少ない (1) を以下の検討に用いた。

3.2 溶離イオン種

大きな紫外吸収を有する溶離液として, 本原理への適用が報告されているもの²⁾を含む, ヨウ化物イオン, 安息香酸イオン, フタル酸イオン及びトリメシン酸イオンの各水溶液 (pH 6.5 \pm 0.2 に水酸化ナトリウムで調整)を選び, 標準イオンの分離溶出状況を比較した。フタル酸イオンより溶出力が弱いヨウ化物イオンと安息香酸イオンの両溶液は, 濃度を上げてても硝酸イオンや硫酸イオンなどの溶出が遅く, 迅速分析には不適切であった。又, 溶出力が最も強いトリメシン酸溶液は, 1×10^{-4} M 以上の濃度で, 塩化物イオンと先端のウォーターディップピークとの分離が不十分となり, それ以下の濃度では, 分離の再現性が悪かった。以上から, 本目的にはフタル酸イオン溶液が最も適当であった。

3.3 溶離液濃度

イオン交換モードでは, 試料イオンの相対保持容量 (k') と溶離イオン濃度 (A) との間に $\log k' = -(y/x) \times \log A + C$ (x, y : 試料イオン及び溶離イオンのイオン価数, C : 定数) が成立する³⁾。フタル酸が主にジアニオンとして存在する本 pH 条件 (3.4) でも, $\log k'$ と $\log[\text{フタル酸二ナトリウム}]$ との間に, 試料イオンの存在状態 (イオン価数) によって異なる傾きの直線関係が得られた。基準条件は, 分離が良好な 5×10^{-4} M と定めた (Fig. 2)。

3.4 溶離液 pH

フタル酸水溶液に水酸化ナトリウムを添加して溶離液 pH を調整し, 標準イオンの k' に及ぼす影響を検討した (Fig. 3)。フタル酸は, 二つの解離基 ($\text{p}K_{a1}$ 2.95, $\text{p}K_{a2}$ 5.41)⁴⁾を有し, 存在状態が pH によって変化するとともに, 溶出力は, ジアニオン型のほうがモノアニオン型より強いと考えられる。検討 pH 領域で存在状態が変化しない標準イオン (塩化物イオン, 亜硝酸イオン, 臭化物イオン, 硝酸イオン, 硫酸イオン) の k' が, pH の上昇によっていずれも単調に減少したことは, ジアニオン型フタル酸イオン濃度の増加の効果として説明されよう。

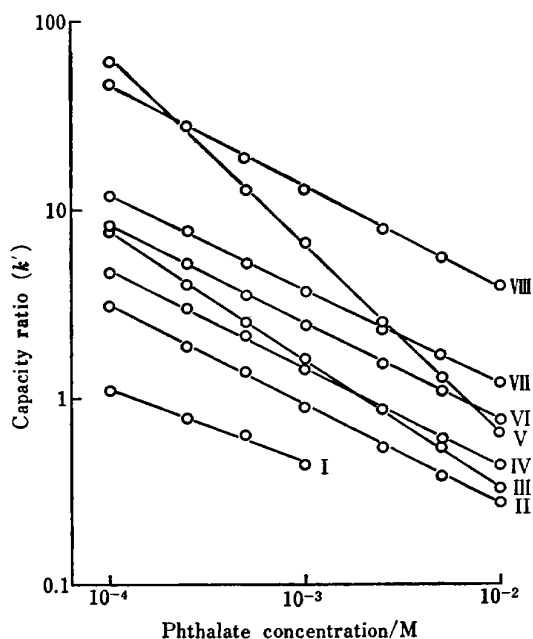


Fig. 2 Effect of eluent concentration on capacity ratio (k')

I: HCO_3^- ; II: Cl^- ; III: H_2PO_4^- ; IV: NO_2^- ; V: SO_4^{2-} ; VI: Br^- ; VII: NO_3^- ; VIII: I^- . The other conditions are the same as described in 3-2.

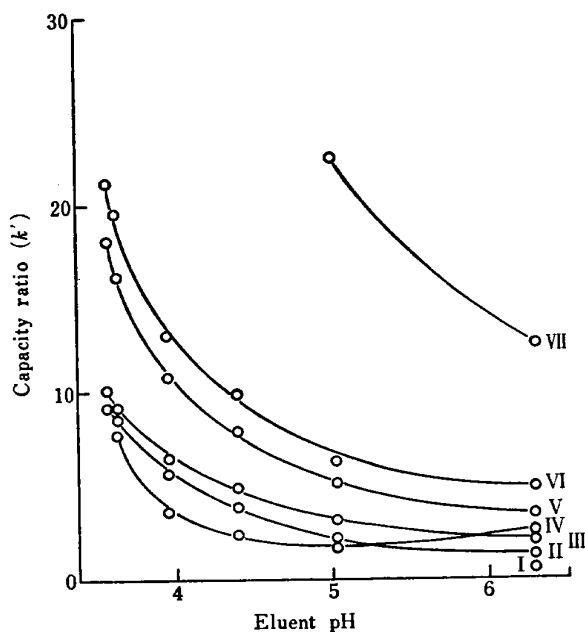


Fig. 3 Effect of eluent pH on capacity ratio (k')

I: HCO_3^- ; II: Cl^- ; III: NO_2^- ; IV: $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$; V: Br^- ; VI: NO_3^- ; VII: SO_4^{2-} . The other conditions are the same as described in 3-2.

ところが、リン酸イオンと炭酸イオンの存在状態は検討 pH 領域で変化する。まず、リン酸 ($\text{p}K_{a1}$ 2.10, $\text{p}K_{a2}$ 6.71, $\text{p}K_{a3}$ 11.8)⁶⁾は、低 pH ではモノアニオン型が主体であるが、pH が上昇するほど、ジアニオン型の割合が増加する。pH > 5 で、リン酸イオンの k' が増

加したのは、保持が強いジアニオン型の割合が増加するためと考えられ、Fig. 2 のリン酸イオンの直線の傾きが $-1/2$ と -1 の間を示した結果と一致する。炭酸の $\text{p}K_{a1}$ は 6.34⁶⁾と大きい。解離が進む高 pH (pH 6.3) では、炭酸イオンのピークは塩化物イオンより前に鋭く現れた (Fig. 3) が、pH が低下すると、ピークの幅は広がり面積は減少し、pH < 5 では消滅した (Fig. 4)。これは、pH の低下によって、解離型炭酸イオンの濃度が低下するためと考えられる。このような溶離液 pH の低下によるピーク面積の減少は、カルボン酸などの他の弱酸でも観察され、弱酸類の検出感度が溶離液 pH に強く依存することを示している。

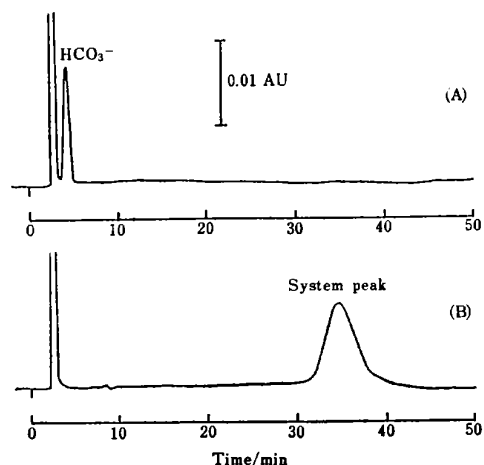


Fig. 4 Carbonate ion peak and system peak

Sample: 1×10^{-4} M disodium carbonate; Eluent: (A) 1×10^{-3} M disodium phthalate (pH 6.7), (B) 1×10^{-3} M sodium phthalate (pH 4.3). The other conditions are the same as described in 3-2.

溶離液 pH の低下による炭酸イオンピークの消去は、高濃度の炭酸イオンを含む試料中の微量塩化物イオンの分析に有効であるが、pH < 5 のとき本システムでは、注入試料イオン種に依存しない大きなピーク (通常、負ピーク) が硝酸イオンと硫酸イオンの間に生じた (Fig. 4)。この現象は、電気伝導度検出 IC で報告され、幾つかの機序が推定されているディップピークの一つと同一と考えられる⁸⁾⁹⁾。このピークは、フタル酸 (又はフタル酸イオン) の溶出位置と一致し、試料に溶離液を添加すると縮小するが、実際試料の直接注入分析では、迅速連続分析の妨げとなる。以上から、炭酸イオンピークが鋭く、妨害ディップピークが出現しない、中性 pH 領域に溶離液を調整するのが良いと考えられる。なお、好氣的条件では、 5×10^{-4} M フタル酸二ナトリウム溶液の pH は、そのままでもほぼ上記範囲に保たれ、調製が容

易なことから、微量炭酸イオンの分析以外はこれを用いた。

3.5 カラム温度

カラム温度が上昇すると多くの標準イオンの k' が減少したが、リン酸イオンのみは増加した (Fig. 5)。これは、温度上昇によって、リン酸のモノアニオン型からジアニオン型への解離が促進される¹⁰⁾ためと考えられる。基準条件 (2.3) では、普及型 HPLC 装置で行える条件の設定を目的とし、カラム恒温槽を用いていないが、再現性は恒温槽を用いたほうが良い。

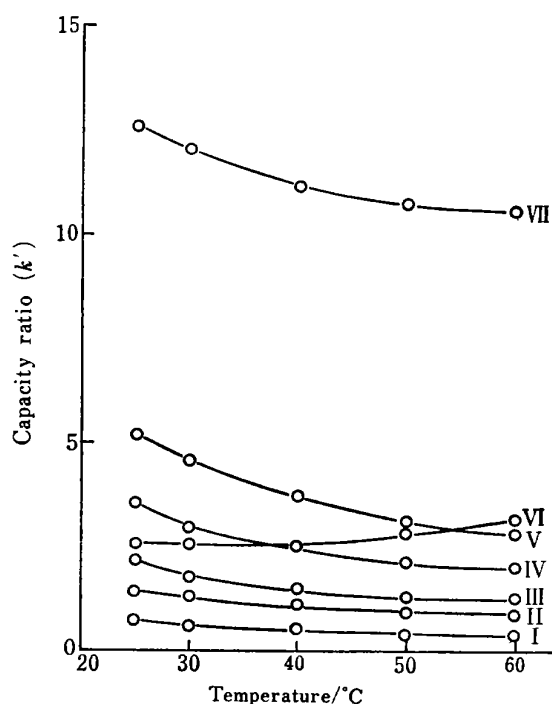


Fig. 5 Effect of column temperature on capacity ratio (k')

I: HCO_3^- ; II: Cl^- ; III: NO_2^- ; IV: Br^- ; V: NO_3^- ; VI: H_2PO_4^- ; VII: SO_4^{2-} . The other conditions are the same as described in 3.2.

3.6 流速

流速が 2 ml/min 以下では、流速が増加すると、 k' は変化せずすべての標準イオンの保持時間は短縮した。保持が最も強い硫酸イオンも、流速が 1 ml/min 以上では 20 分以内に溶出した。一方、流速が増加するとカラム効率は低下する傾向があったが、1 ml/min のとき、硫酸イオンについてのカラム理論段数は約 700 段であった。

3.7 検出波長

本原理では、試料イオンと置換して減少するフタル酸

イオンの濃度変化を吸光度測定するので、試料イオンの検出感度 (ピーク面積) はフタル酸イオンの吸光度に依存する²⁾。標準イオンの検出を 300~225 nm の異なる波長で、入力極性の正負をそのまま接続して記録したクロマトグラムを Fig. 6 に示した。300 nm ではシグナル (S) は現れず、240 nm まで低波長にするほど S が増大したが、いずれもノイズ (N) は小さかった。これは、フタル酸二ナトリウム溶液の紫外吸収が、225 nm 以上では波長が増大するほど減少し、280 nm 付近ではほとんどなくなる事実と一致する。ところが、検出波長が 235 nm では、S は大きい N も大きくなり、更に短波長の 225 nm では、フタル酸イオンの吸光度がより増大するにもかかわらず、S は減少し N は極めて大きくなった。これは、250 nm 以下の波長では、 5×10^{-4} M フタル酸イオンの吸光度が I を越え、用いた検出器では安定したベースラインが得られなくなったためと考えられる。本システムでは、S/N が最大の 240 nm を基準条件としたが、至適検出波長は、溶離液組成や使用検出器によって異なると思われる。

3.8 検出下限と検量線

本原理では、紫外吸収がない試料イオンのピーク面積

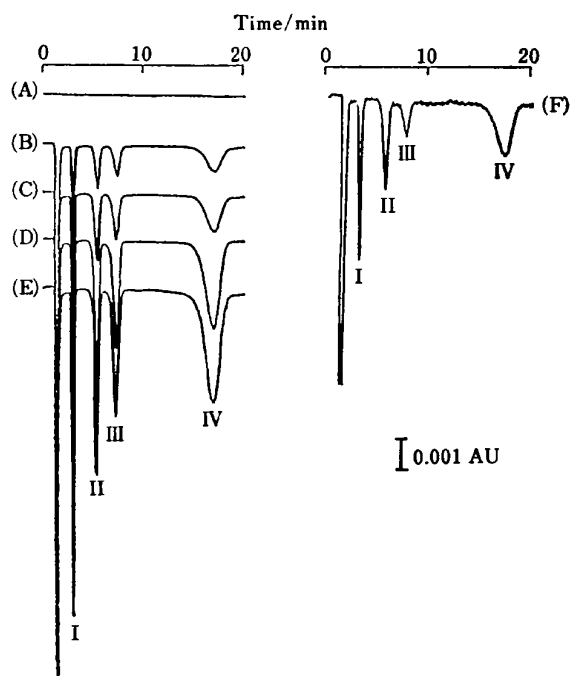


Fig. 6 Effect of detecting wavelength on chromatogram

Wavelength: (A) 300 nm, (B) 270 nm, (C) 254 nm, (D) 240 nm, (E) 235 nm, (F) 225 nm; I: Cl^- (3.5 ppm), II: Br^- (8.0 ppm), III: NO_3^- (6.2 ppm), IV: SO_4^{2-} (9.6 ppm). The other conditions are the same as described in 3.2.

は, 注入量 (モル数) が等しければ試料イオン種によらず, 溶離イオンの吸光度と試料イオンのイオン価数に依存する²⁾. 従って, 試料イオンのピーク高さは, k' が小さいほど, 又, k' が等しければイオン価数が大きいほど大きくなる傾向がある. 基準条件 (2.3) を用いたときの検出下限 ($S/N=3$) は, 塩化物イオン 0.4×10^{-7} M (2 ppb), 硝酸イオン 1.6×10^{-7} M (10 ppb), 硫酸イオン 2.6×10^{-7} M (25 ppb) といずれも ppb レベルに達し, 電気伝導度検出 IC で報告されている値¹¹⁾に比較しても劣らない. 更に, $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ M の範囲でピーク高さ法による検量線を標準イオンについて検討すると, いずれも良好な直線が得られた.

3.9 妨害成分

カラム充てん剤に親和性を有する物質, とりわけ陰イオン性物質は, 本法のクロマトグラムのベースラインを変化させる. すなわち検出波長において, モル吸光係数/イオン価数の値がフタル酸イオンより大きい陰イオンが溶出されれば正ピークを生じ, フタル酸イオンより小さい陰イオンは負ピークを生ずる¹²⁾ので, これらが目的陰イオンの溶出と重なるときは分析の妨害となる. 通常の環境試料にはこのような妨害成分は少ないと推定されるが, 有機酸, 特にカルボン酸⁷⁾のなかには溶出位置が近接するものもあり, これらを多く含む試料については, 分離条件や前処理条件を検討する必要がある.

3.10 実際試料分析

環境試料の分析例として, 雨水と水道水 (著者らの所属機関で採取) を $100 \mu\text{l}$ ずつ直接注入したときのクロマトグラムを Fig. 7, Fig. 8 に示した. 炭酸イオン,

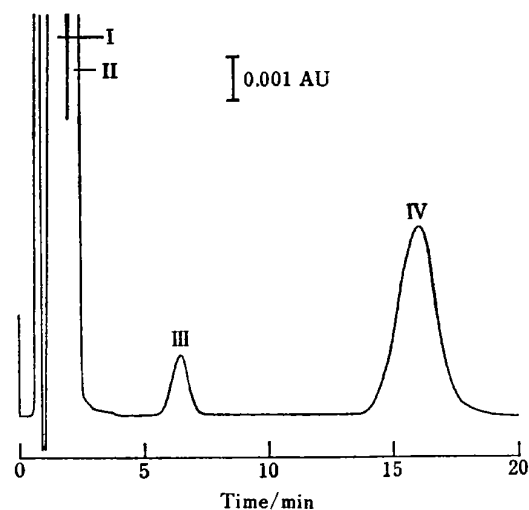


Fig. 8 Chromatogram of tap water

I: HCO_3^- (18 ppm); II: Cl^- (7.8 ppm); III: NO_3^- (0.81 ppm); IV: SO_4^{2-} (4.8 ppm). The conditions are described in 3.2.

塩化物イオン, 硝酸イオン, 硫酸イオンが検出され, これらのイオン種の定量を妨害するピークは認められなかった. 又, 雨水 (Fig. 7 とは異なる) について, 本法による分析結果と従来法による分析結果とを比較すると, 両者の値は比較的良好一致し, しかも, 本法の分析値のばらつきも小さいことが分かった (Table 1). このように, 環境試料中の主要無機陰イオンが, 本法を用いれば, 前処理なしに 20 分以内に精度良く一斉分析できる.

Table 1 Comparison of present method with other methods for the determination of inorganic anions in rain water

Method	Concentration, ppm ^{a)}		
	Cl^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
Present method	1.09 ± 0.02	0.71×0.01	1.40 ± 0.06
Mohr's titration ¹³⁾	1.17 ± 0.12		
Sodium salicylate colorimetry ¹⁴⁾		0.71 ± 0.11	
SIA ^{b)}			1.45 ± 0.12

a) Mean \pm S. D. ($n=3$); b) Sulfate ion analyzer¹⁵⁾

文 献

- 1) H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman: *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 2) H. Small, T. E. Miller, Jr.: *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 3) 早川和一, 平木博美, 宮崎元一: 分化, **32**, 504 (1983).
- 4) 早川和一, 蛭名令子, 松本美枝子, 宮崎元一: 分化, **33**, 390 (1984).

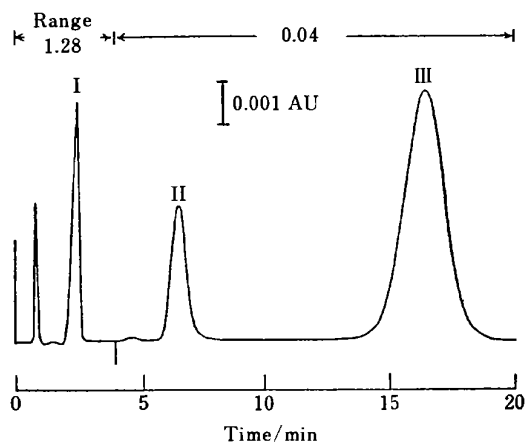


Fig. 7 Chromatogram of rain water

I: Cl^- (22 ppm); II: NO_3^- (1.6 ppm); III: SO_4^{2-} (6.0 ppm). The conditions are described in 3.2.

- 5) 武藤義一, 及川紀久雄編: “イオンクロマトグラフィ”, p. 9 (1983), (講談社).
- 6) 日本分析化学会編: “改訂3版分析化学データブック”, p. 122 (1983), (丸善).
- 7) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: 日本分析化学会第33年会講演要旨集, p. 678 (1984).
- 8) J. S. Fritz, D. L. Duval, R. E. Barron: *Anal. Chem.*, **56**, 1177 (1984).
- 9) T. Okada, T. Kuwamoto: *Anal. Chem.*, **56**, 2073 (1984).
- 10) 日本化学会編: “化学便覧基礎編”, p. 844 (1966), (丸善).
- 11) 安部商事株式会社編: イオンクロマトグラフ巡回セミナー/応用別セミナー講演会資料, p. 13 (1984).
- 12) 早川和一, 宮崎元一: 日本分析化学会第33年会講演要旨集, p. 680 (1984).
- 13) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1980”, p. 62 (金原出版).
- 14) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1980”, p. 68 (金原出版).
- 15) 中柴篤男, 降矢一美, 三方鶴雄, 山中実: 日化, **1977**, 1655.

☆

Determination of inorganic anions by photometric ion chromatography: use of a popular ion exchange column and a conventional high performance liquid chromatograph. Kazuichi HAYAKAWA, Hiromi HIRAKI, and Motoichi MIYAZAKI* (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa Uni-

versity, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920)

A photometric determination method of microamounts of inorganic anions has been developed by conventional high performance liquid chromatography using a popular ion exchange column. Inorganic anions (HCO_3^- , Cl^- , NO_2^- , H_2PO_4^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , and I^-) were separated on an anion exchange column by using disodium phthalate solution as an eluent, and detected as troughs in the base line absorbance by a UV monitor. The optimum conditions for the determination of HCO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- , Br^- , NO_3^- , and SO_4^{2-} were as follows: column, Zipax SAX (2.1 mm i.d. \times 50 cm); eluent, 5×10^{-4} M disodium phthalate; flow rate, 1 ml/min; column temperature, ambient; detection wavelength, 240 nm. Under the conditions described above, detection limits of these anions were at levels as low as ppb. The calibration curves gave straight lines by either peak height or peak area method. Main inorganic anions contained in environmental samples could be simultaneously determined by the proposed method, and their analytical results were close to those obtained by other methods.

(Received January 18, 1985)

Keyword phrases

indirect photometric detection of inorganic anions; high performance liquid chromatography; popular ion exchange column; environmental sample.