

新しい吸光度検出方式高速液体クロマトグラフィー の応用研究：環境汚染分析法の開発

著者	早川 和一
著者別表示	Hayakawa Kazuichi
雑誌名	平成3(1991)年度 科学研究費補助金 一般研究(C) 研究成果報告書
巻	1990-1991
ページ	10p.
発行年	1992-03-01
URL	http://doi.org/10.24517/00034907



新しい吸光度検出方式高速液体 クロマトグラフィーの応用研究 (環境汚染分析法の開発)

(課題番号 02670975)

平成3年度科学研究費補助金(一般C)研究成果報告書

平成4年3月

研究代表者 早川和一

(金沢大学薬学部助教授)

はしがき

著者らはこれまで、クロマトグラフィーの検出に移動相成分と試料成分の光学的特性、即ち吸光度、の差を利用する「示差吸光度検出法」の開発を進めてきた。この方法は、対象化合物の紫外吸収の有無に拘らず紫外吸光度検出器付きの汎用HPLCで分析できるので、多岐にわたる物質の基本分析法として幅広い活用が期待できる。その一部は、既にイオン性物質を対象に吸光度検出イオンクロマトグラフィーの名称で各種公定法に記載されている。この優れた特性に基づく高性能な方法の開発研究の一環として、本研究は特に現在及び将来に予想される環境問題の機序解明に一層寄与できる分析法の開発を主要目的とした。

以下に、研究成果の概要を報告する。

本研究は、平成2、3年度にわたって文部省科学研究費補助金(一般研究(C))の交付を受け、金沢大学薬学部において行った。研究の実施にあたり御援助いただいた関係各位に深く感謝の意を表する。

研究組織と研究経費は次の通りである。

研究組織

研究代表者： 早川和一（金沢大学薬学部・助教授）
研究分担者： 宮崎元一（金沢大学薬学部・教授）
研究分担者： 山本 敦（富山県衛生研究所・主任研究員）

研究経費

平成2年度	1,800 千円
平成3年度	400 千円
計	2,200 千円



8000-15365-3

金沢大学附属図書館

[研究発表]

1. 学会誌等

- 1) Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Eiichi Mizukami, Kazuichi Hayakawa and Motoichi Miyazaki: Simultaneous determination of organic acids in vinegar by photometric ion chromatography; *Eisei Kagaku*, 36(4), 332-337 (1990).
- 2) 早川和一, 宮崎元一: 吸光度検出器を用いるイオンクロマトグラフィー (解説); *ぶんせき*, 1991(1), 11-17.
- 3) Atsushi Yamamoto, Kazuichi Hayakawa, Akinobu Matsunaga, Eiichi Mizukami and Motoichi Miyazaki: Determination of malic acid enantiomers by ligand-exchange photometric ion chromatography; *Anal. Sci.*, 7(1), 149-150 (1991).
- 4) 早川和一, 山本敦, 宮崎元一: イオンクロマトグラフィー — 基礎研究の進歩 — (進歩総説); *ぶんせき*, 1991(5), 358-363.
- 5) Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Kazuichi Hayakawa, Eiichi Mizukami and Motoichi Miyazaki: Polarized photometric detector for high-performance liquid chromatography; *Anal. Sci.*, 7(5), 719-721 (1991).
- 6) Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Eiichi Mizukami, Kazuichi Hayakawa and Motoichi Miyazaki: Ligand-exchange ion chromatographic determination of malic acid enantiomers in apple juice with photometric detection; *J. Chromatogr.*, 585(2), 315-317 (1991).
- 7) Kazuichi Hayakawa, Kyoko Nomura and Motoichi Miyazaki: On-line removal of interfering alkaline earth metals for simultaneous determination of hydrogen carbonate, chloride, nitrate and sulfate by indirect photometric detection ion chromatography; *Anal. Sci.*, 7(6), 967-969 (1991).
- 8) Tetsuji Chohji, Eiji Hirai, Motoichi Miyazaki, Kazuichi Hayakawa, Kyoko Nomura and Chie Nakagawa: Behavior of inorganic metals ions in soil and contribution of soil ecosystems to acid-neutralization; *J. Pharmacobio-Dyn.*, 14, s-136 (1991).

- 9) Kazuichi Hayakawa, Atsushi Yamamoto and Motoichi Miyazaki: Photometric ion chromatography of biological compounds using metal-complex formation; *J. Pharmacobio-Dyn.*, 14, s-138 (1991).
- 10) Kazuichi Hayakawa, Akio Kato, Atsushi Yamamoto and Motoichi Miyazaki: Selective peak enhancement and suppression of conductometric ion chromatography and its application to the determination of trace levels of orthophosphate in environmental samples; *Anal. Sci.*, 8(1), 25-29 (1992).
- 11) Kazuichi Hayakawa, Kyoko Nomura and Motoichi Miyazaki: Effect of removing atmospheric carbon dioxide from eluent in determination of trace level carbonate-carbon by ion exclusion chromatography; *Anal. Sci.*, 8(1), 111-113 (1992).
- 12) Noriko Imaizumi, Kazuichi Hayakawa, Yasuo Suzuki and Motoichi Miyazaki: Determination of nitrated pyrenes and their derivatives by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection after online electrochemical reduction; *Biomed. Chromatogr.*, 4(3), 108-112, 1990.
- 13) Kazuichi Hayakawa, Ryuichi Kitamura, Mizuka Butoh, Noriko Imaizumi and Motoichi Miyazaki: Determination of diamino- and aminopyrenes by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection; *Anal. Sci.*, 7(4), 573-577 (1991).

2. 口頭発表

- 1) 加藤明夫, 早川和一, 宮崎元一, 山本敦: システムピーク生成を利用したICによるリン酸イオンの高感度分析; 日本薬学会北陸支部第80例会, 富山, 平成2年6月9日.
- 2) 山本敦, 松永明信, 水上英一, 早川和一, 宮崎元一: 配位子交換吸光度検出イオンクロマトグラフィーにおけるリンコ酸光学異性体の分離と検出に関する基礎的考察; 第7回イオンクロマトグラフィー討論会, 京都, 平成2年6月14, 15日.
- 3) Kazuichi Hayakawa, Noboru Okubo, Naoshi Miyashita, Motoichi Miyazaki, Eiichi Hirai, Tetsuji Chohji and Chie Nakagawa:

Photometric ion chromatography for water pollution analysis - Inorganic ions; Water Pollution Reserch and Control, Kyoto, July 29-August 3, 1990, Abstract p33-36.

- 4) 山本敦, 松永明信, 水上英一, 早川和一, 宮崎元一: 配位子交換吸光度検出イオンクロマトグラフィーによる清涼飲料水中のリンゴ酸光学異性体の分析; 日本薬学会第110年会, 札幌, 平成2年8月21-23日.
- 5) 早川和一, 能村京子, 宮崎元一: 陰イオンの分析を妨害する成分を除去するための陽イオン交換カラムを導入した吸光度検出イオンクロマトグラフの効果と環境試料への適用; 第7回イオンクロマトグラフィーフォーラム, 恵那, 平成2年11月8, 9日.
- 6) 加藤明夫, 早川和一, 宮崎元一, 山本敦: システムピークの近傍に溶出する試料ピークの増大効果を利用したICによるリン酸イオンの高感度分析; 日本分析化学会第39年会, 名古屋, 平成2年10月16-18日.
- 7) 宮崎元一: 降水分析のためのイオンクロマトグラフィーの高性能化; 第2回国際学術研究公開シンポジウム, 金沢, 平成2年9月30日-10月2日.
- 8) 山本敦, 松永明信, 水上英一, 早川和一, 宮崎元一: 偏光子を用いた吸光度検出HPLCによる糖類の分析; 日本薬学会第111年会, 東京, 平成3年3月28-30日.
- 9) 山本敦, 松永明信, 水上英一, 早川和一, 宮崎元一: 多塩基性酸溶離剤における保持・溶出機構の解析; 第8回イオンクロマトグラフィー討論会, 新潟, 平成3年6月6, 7日.
- 10) 早川和一, 山本敦, 宮崎元一: 金属の錯体生成反応を利用した生体関連物質のイオンクロマトグラフィー; 第5回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 金沢, 平成3年6月6, 7日.
- 11) Kyoko Nomura, Kazuichi Hayakawa, Motoichi Miyazaki: Environmental water sample analysis using photometric ion chromatography with column switching technique; 韓日国際 The Air Pollution Control Technologies on Stack Emission Gas, 慶州, 韓国, 平成3年10月11日.
- 12) 早川和一, 能村京子, 宮崎元一: 炭酸のイオン排除クロマトグラフィー - 窒素パージによる溶離液処理の効果; 第8回イオンクロマトグラフィーフォーラム, 栃木, 平成3年11月5, 6日.
- 13) 能村京子, 早川和一, 宮崎元一: イオン排除ICによる雨水中の脂肪族カルボ

ン酸と炭酸の高感度同時分析； 第19回北陸公衆衛生学会，金沢，平成3年11月7日。

- 14) 早川和一，能村京子，宮崎元一：炭酸のイオン排除クロマトグラフィー－窒素パーシによる溶離液処理の効果；日本分析化学会第40年会，横浜，平成3年11月21-23日。
- 15) 丁子哲治，平井英二，宮崎元一，早川和一，能村京子，中川千枝，李敏熙，金浩：土壌による酸性降水の中和反応機構の解析－降雨雪を媒体とした大気汚染物質の環境循環と影響(第13報)；環境科学会1991年会，東京，平成3年11月27-29日。
- 16) 山本敦，松永明信，水上英一，早川和一，宮崎元一：偏光吸光度検出法の開発－旋光度測定への応用；日本薬学会第112年会，福岡，平成4年3月29-31日。

3. 出版物

- 1) 早川和一(分担執筆)：イオンクロマトグラフィー，宮崎元一編“わかりやすい高速液体クロマトグラフィー”，広川書店，平成3年6月。

[研究成果]

1. 本研究の背景と目的

水質や大気の汚染が進み、人間生活に影響を及ぼす環境問題がますます深刻になってきた。その原因物質の環境動態を把握することは、汚染の発生メカニズムと生態系に及ぼす影響を明らかにして、有効な防止対策を講ずるために不可欠である。そのための計測手段として、多くのイオン成分が一斉に感度良く分析できるイオンクロマトグラフィー(IC)が大きな役割を担っている。

1983年に著者らは、液体クロマトグラフィーの移動相成分に光吸収性化合物を用いて、溶出される試料成分と移動相成分の光吸収の差に基づいて試料成分を検出する「示差吸光度検出法」を発表した。種々の化合物を光吸収の有無にかかわらず検出できるこの原理は、光吸収を有する化合物しか検出できないと考えられていた従来の吸光度検出法の概念を大きく変革した。特に無機及び有機イオン性化合物を対象とするイオンクロマトグラフィー領域で大きな発展を遂げ、吸光度

検出ICとして既に日本薬学会編「衛生試験法・注解1990」の一般試験法に収載されるなど、種々の公定試験法に収載される趨勢にある。

吸光度検出ICによって、従来の電気伝導度検出ICでは困難であった幾つかの化合物の分析も可能になった。しかし未だに検出が難しい対象もあり、試料によっては感度不足や妨害成分などの問題を克服しなくてはならない。

以上の背景と現状を踏まえて、本研究は新しい理論に基づいた高性能吸光度検出ICの開発を目的として行い、とりわけ環境汚染物質分析法への展開をはかった。

2. ICの保持・溶出機構の理論

吸光度検出及び電気伝導度検出ICの一般理論の構築を目的にして、未だ検討されていない低pH溶離液条件における挙動を解析した。試料ピーク位置における溶離剤成分の濃度変化量に対する試料成分濃度の比(P)と試料ピーク、システムピークの保持比(k'_s 、 k'_s)との間に、(1)式が成立することを明らかにした。

$$P = C \cdot k'_s / (k'_s - k'_s) \quad (\text{但し } C = \text{定数}) \quad (1)$$

(1)式は、試料ピークの溶出がシステムピークより前ならその位置の溶離剤成分の濃度が増加し、後なら減少すること、その程度はシステムピークに近いほど大きいことを示している。したがってノンサプレッサー型ICで吸光度検出を用いると、システムピークより前の試料ピークでは溶離剤成分による増感効果(試料成分の光吸収の有無に拘らず正ピーク)が現れる。一方電気伝導度検出を用いるとシステムピークより前では増感効果が現れ、後では抑制効果が現れることを明らかにした。以上の原理を応用して、食酢中の多種有機酸の一斉分析(1-1)と生活雑排水中の微量リン酸イオンの高感度分析(1-10, 2-1, 2-6)を可能にした。

次に、Hooverモデルに基づく関係式に新しい「溶離剤間分離係数」を導入することにより、これまで困難であった多塩基酸溶離液系における試料成分と溶離剤成分の保持・溶出挙動の解析を可能にした(2-9)。

3. 自動前処理IC

IC分析を妨げる共存物質の除去と目的成分の濃縮の自動化を目的にして、カラムスイッチング法を応用した自動前処理ICの試作とその応用を行った。

(1)妨害成分のオンライン除去: フタル酸塩のようないくつかの有機酸塩系溶離液を使用する吸光度検出ICで見られるマグネシウムイオンやカルシウムイオンの妨害を除くために、流路切り替えバルブをはさんで除去カラム(イオン交換容量

が大きな陽イオン交換カラム)を分析カラム(陰イオン交換カラム)と直列に配置するシステムを試作した。更に分離の劣化を防ぐためのハートカッティング法を考案した。システムの操作を自動で行うことにより、炭酸水素、塩化物、硝酸、硫酸等の陰イオンの精度の高い連続同時分析が可能になった(1-7, 2-5, 2-11)。

同様のカラムスイッチングシステムを、上述の生活雑排水中のリン酸の増感IC分析に応用して、 1×10^{-11} モル(注入量)のリン酸分析を可能にした(1-10)。

(2)微量成分のオンライン濃縮: 既に報告されている電気伝導度検出方式だけでなく、吸光度検出方式ICでも数十~数百倍のオンライン濃縮分析が可能な濃縮ICシステムを試作した。このシステムを用いることにより、南極水床コア中の数~数十 ppbレベルの陽陰イオンが分析ができた(2-7)。

4. 吸光度検出ICの機能性溶離剤

イオン性で紫外吸収が大きく配位特異性の高い金属錯体のなかから、以下の特性を有する新しい吸光度検出IC用溶離剤を開発した(1-9, 2-3, 2-10)。

(1)高感度検出: 吸光度検出ICでは、溶離剤の紫外吸光度が大きいほど、またイオン交換溶出力が強いほど、検出感度を向上させることができる。 Cu^{2+} のトリエチレンテトラミン錯体(Cu:trien = 1:1)、及びエチレンジアミン錯体(Cu:en = 1:2)はいずれも二価陽イオンであり、紫外吸光度及びイオン交換溶出力のいずれにおいても Cu^{2+} より優れている。これらを溶離剤に用いると、 Cu^{2+} 溶離液系より検出感度が2~3桁向上し、その結果 数~数百ppbのアルカリ土類イオンの分析が可能になった。

(2)陽陰イオン一斉分析: エチレンジアミン四酢酸と金属イオンの陰イオン錯体のうち、銅(II)錯体は大きな紫外吸収がある。そこでエチレンジアミン四酢酸銅二ナトリウムとエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの混合溶離剤を用いることにより、マグネシウムやカルシウム等の陽イオンと炭酸水素、塩化物、硝酸、硫酸等の陰イオンの一斉分析法を開発した。この方法により、河川水、地下水、生体液中の主要陽陰イオンが一回の注入で分析できるようになった。

(3)光学異性有機酸分析: 紫外吸収を有する Cu^{2+} -有機酸錯体の錯体うち、構造が近似し安定度定数も近い Cu^{2+} -D-リンゴ酸錯体と Cu^{2+} -L-酒石酸錯体は配位子置換が起りやすい。陰イオン交換カラムで Cu^{2+} -L-酒石酸(1:2)を溶離液とすると、この反応に基づいてリンゴ酸がL-, D-の順番に分離溶出され、前者は正または負ピーク(溶離液pHにより異なる)、後者は負ピーク(溶離液pHによらない)

として検出できた。本法を「配位子交換吸光度検出IC」と名付けた(1-3, 2-2)。本法により、清涼飲料水中の添加リンゴ酸の分析が可能になった(1-6, 2-4)。

配位子交換吸光度検出ICは、まだCu²⁺-リンゴ酸-酒石酸系のみで検討されたに過ぎないが、光学異性体の分析が一般的なカラムで実行できるだけでなく、高い特異性に基づく妨害ピークの生成が極めて少ない点でも有用な原理である。

5. 炭酸のIC

炭酸（及びそのイオン）は水の性質を示す主要な陰イオン成分の一つである。また、地球温暖化の原因ガスである二酸化炭素とも関連して、陸・海水や降水の炭酸分析は重要な項目である。電気伝導度検出ICでは、炭酸は解離が抑制されるために分析が困難な対象と考えられてきた。これに対して、任意のpHの溶離液を使用できる吸光度検出ICは、炭酸水素イオンとして分離・検出することができる。

しかし、従来の吸光度検出ICシステムでは、大気中の二酸化炭素が溶離液に溶解するために、微量分析が妨害される。そこで、ヘンリーの法則に基づいて大気を窒素に置換することによって、溶離液中に溶解する二酸化炭素を除去するシステムを考案した結果、10⁻⁶ M以下の炭酸水素イオンが塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン等と同時に分析できるようになった。更に、前述の妨害成分のオンライン除去ICシステムを組み合わせることにより、地下水や河川水、雨水などの環境試料への適用も可能になった。

一方、電気伝導度検出イオン排除クロマトグラフィーにおいて、条件によっては炭酸のピークも出現することが知られていたが、再現性と感度が悪く定量分析に利用されることはなかった。著者らは、この原因が大気中の二酸化炭素にあると考え、上述の窒素通気法をイオン排除クロマトグラフィーにも応用した。その結果、炭酸が低級の有機酸と同時に吸光度検出ICを用いた場合と同レベルまで分析でき、雨水などの環境試料にも適用できた(1-11, 2-12, 2-13, 2-14)。

6. 偏光吸光度検出法

吸光度検出器のセルの前後に二枚の偏光子を設置すると、吸光度(Abs)と旋光度(α)との間には(2)式が成立する。二枚の偏光子間の回転角(X rad)を予め十分

$$\text{Abs} = C \cdot \alpha^2 \quad (c, \text{定数}) \quad (2)$$

大きくとったとき、セルを光学活性物質が通過する際の吸光度変化量(ΔAbs)と旋光度(α_0)の間には(3)式が成立する。 α_0 は試料濃度に比例するので、 ΔAbs は

$$\Delta \text{Abs} = 2C \cdot X \cdot \alpha. \quad (3)$$

セル内に存在する光学活性物質の濃度に比例する。以上の原理に基づく偏光吸光度検出法を開発した。本法は光学活性ではあるが紫外・可視吸収がない糖などに応用することができ、その検出感度も液体クロマトグラフィー用検出器として現在用いられている旋光度計に劣らない(1-5, 2-8, 2-16)。また、この原理に基づいた新しい機能と特性を有する検出器の開発が期待できる。

7. ニトロピレン類の還元—化学発光検出HPLC法

複雑なマトリックスの環境試料の中から目的の微量成分を精製したり検出したりする場合には、多くの化合物を検出できる吸光度検出法と特異性や感度が極めて高い検出法を組み合わせた方法が必要になる。強い変異原性を有する多環芳香族炭化水素であるニトロピレン類は大きな紫外吸収を有するが、その還元体であるアミノピレン類は化学発光に対して感度と特異性が極めて高いという特徴がある。そこで、オンライン電気化学還元—化学発光検出HPLC(1-12)及びオフライン化学還元—化学発光検出HPLCによるニトロピレン類の超高感度分析法を開発した。これらの方法を用いると、ディーゼル車及びガソリン車排ガス中のジニトロピレンが分析できた(1-13)。

変異原性ニトロアレーンの中にはジニトロピレンの様に、従来の方法では検出感度が不足し、人への暴露量や健康影響の推定に不可欠な環境動態がほとんどわかっていないものが少なくない。本法はこれらの化合物の環境動態研究上極めて有用な分析法として期待できる。

8. 結語

本研究の基礎をなす吸光度検出法の理論は、旧来の吸光度検出法の概念を大きく変革し、その検出対象を飛躍的に拡大したと言えるであろう。しかし、示差吸光度検出法の応用研究の多くはこれからであり、偏光吸光度検出法はまさに基礎研究が始まったばかりである。著者らは、本報告書が少しでも新しい吸光度検出理論の発展に寄与するとともに、それが環境汚染物質はもとより、他の多くの対象の分析法の開発にも有効に活かされることを願う次第である。