

総合論文

海水中微量無機陰イオンの定量のための 新規イオンクロマトグラフィー固定相の開発

江 曉 林¹, 栄 麗¹, 鈴木 敦¹, 小林 賢洋¹, Lee Wah Lim¹, 竹内 豊英^{®1}

イオンクロマトグラフィーによる海水中陰イオンの高感度定量のための新規固定相を開発した。海水主成分と同程度の濃度を有する溶離液を用いることのできる固定相を調製することに成功し、海水を前処理することなく直接注入することができた。ポリエチレングリコール固定相では、溶離液の濃度が高くなるほどヨウ化物イオン及びチオシアン酸イオンの保持が増大することを見だし、海水中のこれらのイオンの定量を可能とした。第4級アンモニウム型の陽イオン界面活性剤をイオン交換及び疎水性吸着を利用してシリカゲルに物理的に吸着させたカラムについても濃度の高い溶離液の使用が可能となり、海水中の臭化物イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン等の定量に応用できることを見出した。モノリス型シリカキャピラリーカラムに適用し、海水中臭化物イオンの迅速定量を実現した。カラム内径の増加に伴い濃度感度が改善され、コンベンショナルサイズ（内径 4.6 mm）のカラムを用いることにより ng/mL レベルの検出感度を達成した。

1 緒 言

海水中溶存成分の定量は海洋の環境や動態を理解する上で重要であり、各種分離分析法や分光光度法などによるアプローチが多数報告されている。

海水中微量陰イオンは、高濃度マトリックスイオンの存在のために定量が難しく、これらの妨害を避けるためにこれまでイオンクロマトグラフィー^{1)~7)}をはじめ、フローインジェクション分析法⁸⁾⁹⁾、キャピラリー電気泳動法^{10)~12)}などにおいて様々な工夫がなされてきた。中でも、イオンクロマトグラフィーは、分析法の簡便さ、迅速性、頑健性に優れているため多くの研究が取り組まれてきており、海水中微量陰イオンの定量に対していろいろな手法が提案されてきている。

イオンクロマトグラフィーにおける海水中微量陰イオンの分析の際には高濃度の主成分イオンの妨害を避けなければならない。海水には約 500 mM の塩化物イオン及び約 30 mM の硫酸イオンが主成分陰イオンとして含まれている。主成分イオンの妨害は、これらのイオンを同程度の濃度で含む溶離液を用いれば除くことができる。Ito¹⁾は、スチレンジビニルベンゼン系の陰イオン交換カラムを用い、溶離液として 0.5 M 塩化ナトリウム、0.03 M 過塩素酸ナトリウム及び 5 mM リン酸緩衝液の混合溶液を用いることにより海水中の微量ヨウ化物イオンの定量に成功している。また、Maruo ら²⁾は、高いイオン交換容量のカラムを

用い、高濃度溶離液（0.5～2 M 塩化リチウム水溶液）により海水中硝酸イオンや亜硝酸イオンの定量を可能としている。中村ら³⁾も同様な考え方で 0.5 M の塩化ナトリウム水溶液を溶離液として海水中の硝酸イオン、亜硝酸イオン及び臭化物イオンの定量を行っている。

セチルトリメチルアンモニウム（CTA）イオンを物理的にコーティングしたモノリス型シリカ系（Chromolith Speed ROD RP-18e 又は Chromolith RP-18e）あるいは通常の球状シリカ系 ODS カラム（TSKgel ODS-80Ts QA）を用い、0.5 M 塩化ナトリウム水溶液を溶離液として海水中の硝酸イオン及び亜硝酸イオンの定量が報告されている⁴⁾⁵⁾。

また、Huang ら⁶⁾はカラムスイッチング法により妨害となる成分の除去を行うことにより海水中硝酸イオンの定量を可能としている。

更に、ツヴィッターイオン型の固定相に対する塩化物イオン及び硫酸イオンの保持が小さいことを利用して、主成分イオンによる妨害なく海水を直接注入定量できるシステムが報告されている⁷⁾。この方法により海水中ヨウ化物イオンの定量がなされている。

本研究では、イオンクロマトグラフィーにおいて海水中陰イオンの高感度定量を可能とする新しい固定相の開発を行った。特に、高濃度な溶離液の使用を可能とすることで海水を希釈することなく直接注入できる固定相の開発を目標とした。

ポリエチレングリコール（PEG）は、高濃度の塩を含む水溶液から相分離することが知られている¹³⁾。例えば、500 mM の硫酸ナトリウム水溶液に平均分子量 2 万の PEG

¹ 岐阜大学工学部応用化学科：501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1

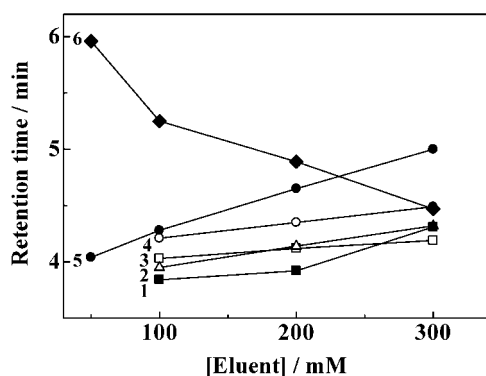


Fig. 1 Retention time of iodide as a function of the eluent concentration on a PEG-coated C30 column

Column: laboratory-made C30 packed column (100 × 0.32 mm I.D.) modified with 5% PEG 20000; Eluent: 1 = magnesium sulfate, 2 = potassium chloride, 3 = sodium chloride, 4 = lithium chloride, 5 = sodium sulfate, 6 = ammonium sulfate; Flow-rate: 2.1 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injection volume: 0.2 μL ; Sample: 1 mM sodium iodide; Adapted from ref. 15 with permission from Elsevier.

を5% 加えて混合し静置すると2層に分かれる。本研究ではこの現象に基づいてPEGをイオンクロマトグラフィーの分配型固定相としての利用を検討した。また、第4級のアンモニウムイオン型の陽イオン界面活性剤がシリカゲルに導入できることを利用し¹⁴⁾、イオンクロマトグラフィー用の固定相の開発を行った。

2 実験

2.1 装置

固定相の評価に用いたイオンクロマトグラフは、ポンプ、インジェクター、分離カラム、検出器（紫外吸光検出器）及びデータ処理装置から成る。分離カラムがキャピラリーカラムの場合には0.5 mL内容積のガスタイトシリンジを装着したマイクロフィーダーをポンプとして使用した。一方、コンベンショナルサイズのカラムの場合にはダブルプランジャー型のポンプを使用した。また、分離カラムのサイズを考慮し、それぞれに適した検出器フローセル及びインジェクターを選択した。

2.2 固定相の調製

2.2.1 表面修飾型PEG固定相の調製 内径0.32 mmのフューズドシリカキャピラリーに粒子径5 μm のDevelosil C30-UG-5（野村化学製）を充填し、イオン交換水で洗浄した後、PEG水溶液を流量2.1 $\mu\text{L/min}$ で3時間送液した。更に、20分間イオン交換水で洗浄した後、溶離液を通液した。本研究では修飾剤のPEGの分子量並びに濃度を検討した¹⁵⁾。コンベンショナルサイズ（内径4.6 mm）のカラムの場合には、0.3 mL/minの流量で3時間

PEG水溶液を通液した¹⁶⁾。

2.2.2 化学修飾型PEG固定相の調製 化学結合型PEGは、粒子径5 μm のシリカゲルにジオール基及び塩化オキサリルを介して調製した¹⁷⁾。ジオール型のシリカゲル（Develosil 100Diol, 野村化学製）に塩化オキサリルをジクロロメタン中、24時間室温（約25℃）で反応させた後、PEGジクロロメタン溶液を加え、ピリジンを触媒として24時間室温で反応を進めた。反応後、ジクロロメタン及びメタノールで洗浄し、フューズドシリカキャピラリーに充填した。また、同様にジオール基を導入したC30充填剤に塩化オキサリルを用いて化学結合型のPEG固定相を調製した。ジオール基とC30の両官能基が結合したシリカゲルは野村化学より入手した。

2.2.3 陽イオン界面活性剤を用いた固定相の調製 シリカゲルカラムとして内径0.10 mmのモノリス型シリカキャピラリー¹⁸⁾¹⁹⁾、内径0.32 mmの充填シリカキャピラリーカラム及び内径4.6 mmのコンベンショナルサイズのシリカカラムについて検討した。修飾剤としてセチルトリメチルアンモニウムクロリド（CTAC）、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）又はジラウリルジメチルアンモニウムブロミド（DDAB）を使用した。これらの界面活性剤を含む水溶液を各シリカゲルカラムにポンプで通液した後、溶離液で洗浄後、分析に使用した。

3 結果と考察

3.1 表面修飾型PEG固定相

3.1.1 保持挙動 修飾に用いたPEGの分子量（1000～20000）及び濃度（1～5%）について検討したところ、分子量及び濃度が増大するにつれて試料陰イオンの保持が増大したので、濃度5%（w/w）の平均分子量20000のPEGを最適修飾条件とした¹⁵⁾。

PEG固定相の保持挙動をFig. 1に示す¹⁵⁾。溶離液として塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム又は硫酸アンモニウム水溶液を用い、ヨウ化物イオンの保持時間を検討したところ、硫酸アンモニウムを除いて溶離液の濃度が高いほど保持が増大し、通常のイオンクロマトグラフィーとは逆の保持挙動が観察された。

また、Fig. 1は、溶離液の陰イオンのみならず陽イオンもヨウ化物イオンの保持時間や保持挙動に影響を与えていることを表している。強く水和する硫酸イオンを溶離液陰イオンとした場合、溶離液陽イオンがアンモニウム、ナトリウム、マグネシウムイオンの順にヨウ化物イオンの保持が小さくなっており、この順序は水和しやすい陽イオンの順序（ $\text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+}$ ）と一致した。一方、中程度に水和している塩化物イオンを溶離液陰イオンとして選択した場合も、溶離液陽イオンが水和しやすいほどヨウ化物

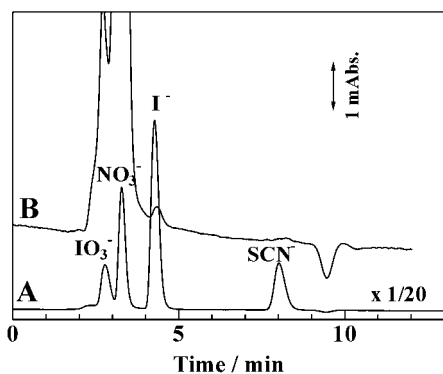


Fig. 2 Separation of iodide in seawater sample on a PEG-coated C30 column

Column : laboratory-made C30 packed column (100 × 0.32 mm I.D.) modified with 5% PEG 20000 ; Eluent : mixture of 300 mM sodium sulfate and 50 mM sodium chloride ; Flow-rate : 2.1 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injection volume : 0.2 μL ; Samples : A = 0.1 mM each of iodate, nitrate, iodide and thiocyanate, B = seawater ; Wavelength of UV detection, 220 nm ; Adapted from ref. 15 with permission from Elsevier.

イオンの保持が大きい傾向が見られる ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$). 以上の結果から, PEG を固定相とした場合には, 溶離液の陽イオンと陰イオンの組み合わせにより保持が変化することが分かった.

Hofmeister シリーズ²⁰⁾²¹⁾において硫酸イオンと塩化物イオンは塩析効果のあるイオン (water-structure-maker あるいは cosmotropic ions) として位置付けられており, これらのイオンと接触することにより PEG 固定相から水が移動することにより固定相の疎水性が増すことが考えられる. Fig. 1 において溶離液の濃度の増加に伴って保持が増大したのはこの塩析効果によって説明できる. また, 硫酸イオンは塩化物イオンより塩析効果が強く, 硫酸イオンを溶離液とした場合のほうが塩化物イオンを溶離液とした場合よりも保持が大きくなっているのは, 前者の場合に固定相がより疎水性を高めているためと考えられる. 更に, 溶離液にアセトニトリルを添加すると疎水性イオンであるヨウ化物イオン及びチオシアン酸イオンの保持が減少したこと, また, PEG にイオン交換基がないことから試料陰イオンの保持は, PEG 相への分配に基づいていると判断した. なお, 現時点では硫酸アンモニウムを溶離液とした場合に他の溶離液と異なる保持挙動が観察された理由は解明されていない.

以上の結果から, PEG を固定相とした場合, 高濃度の硫酸ナトリウム溶離液がヨウ化物イオンの定量に適していることが分かった. Fig. 2 に PEG 固定相による 4 種陰イオン及び海水中のヨウ化物イオンの分離検出例を示す. 海水は 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後, 0.2 μL を希釈することなく注入した. しかしながら, 溶離液

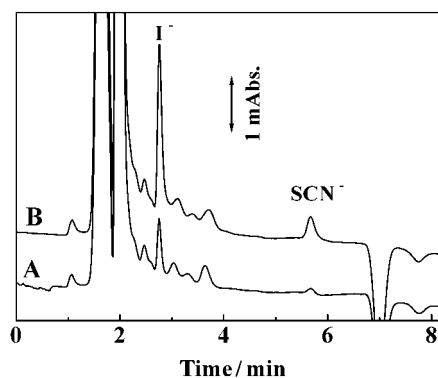


Fig. 3 Separation of iodide and thiocyanate in seawater sample on a conventional-size PEG-coated column

Column : conventional-size C30 column (150 × 4.6 mm I.D.) modified with 5% PEG 20000 ; Eluent : 300 mM sodium sulfate and 50 mM sodium chloride ; Flow-rate : 1.0 mL min^{-1} ; Samples : 20 μL seawater for lower trace (A), sea water spiked with 254 ng mL^{-1} iodide and 58 ng mL^{-1} thiocyanate for trace (B) ; Wavelength of UV detection, 220 nm ; Reproduced from ref. 16 with permission from Vieweg Publishing.

を 300 mM 硫酸ナトリウム水溶液とした場合には標準試料のヨウ化物イオンと同一の保持時間にピークが現れなかったため, 溶離液に 50 mM の塩化ナトリウムを加えところヨウ化物イオンを分離検出できることが分かった. これは, 溶離液にマトリックスイオンを加えることにより, その影響を低減できたものと判断できる. 標準添加法により, 海水中ヨウ化物イオンの定量を行ったところ, 検討した海水中ヨウ化物イオンの濃度は 90 ng/mL であった.

Fig. 2 の条件下では標準試料の保持時間, ピークシグナルの再現性は 0.2~1.0% であった. また, 検出限界 ($S/N = 3$) は 9 ng/mL , 定量限界 ($S/N = 10$) は 30 ng/mL であった. なお, Fig. 2 の条件下では海水中のチオシアン酸イオンも検出したが, 定量には至らなかった.

3.1.2 コンベンショナルサイズカラムの利用 コンベンショナルサイズ (内径 4.6 mm) のカラムを利用することにより, 濃度感度を改善することができた¹⁶⁾. キャピラリー充填カラムの場合と同様に C30 カラムに PEG を修飾して海水中微量陰イオンの定量に応用した. 試料注入体積が Fig. 2 の 100 倍に相当する 20 μL とすることで, ヨウ化物イオンの検出感度 ($S/N = 3$) は 0.5 ng/mL , また, 定量限界 ($S/N = 10$) は 2.0 ng/mL と約 15 倍の濃度感度の改善をみた. 一方, チオシアン酸イオンについては検出感度 ($S/N = 3$) 2.0 ng/mL , また, 定量限界 ($S/N = 10$) 6.0 ng/mL が達成された.

Fig. 3 にコンベンショナルサイズカラムを用いたときの海水中微量ヨウ化物イオン及びチオシアン酸イオンの分離検出例を示す. Fig. 3 において上側のクロマトグラム (B) は海水に標準試料を添加した場合のクロマトグラムを示し

Table 1 Analysis of seawater samples for iodide and thiocyanate ion

Seawaters	Iodide concentration ^{a)} / ng mL ⁻¹	Thiocyanate concentration ^{a)} / ng mL ⁻¹
Nagoya port	83.0	15.0
Toba	67.6	10.9
Toujinbou	47.9	10.4
Okinawa	24.9	8.1

a) Average of 4 determinations ; Operating conditions as in Fig. 3 except for samples. Reproduced from ref. 16 with permission from Vieweg Publishing

ている。

標準添加法により，国内数箇所の海水に含まれるヨウ化物イオン及びチオシアン酸イオンを定量した結果を Table 1 に示す¹⁶⁾。その結果，ヨウ化物イオンについて 24.9～83.0 ng/mL，また，チオシアン酸イオンについて 8.1～15.0 ng/mL の定量結果を得た。なお，海水中ヨウ化物イオンの定量結果は幾つかの研究グループにより報告されている。ヨウ化物イオンの濃度は水深や季節により変動し，水深が増加するにつれて減少し，夏のほうが冬より高い値が報告されている。例えば，表面水では 19 ng/mL 程度であるが，夏の表面水では 41～108 ng/mL の高い値が報告されている²²⁾。また，Chandramouleeswaran ら²³⁾は，海水中ヨウ化物イオンの定量結果として 48～60 ng/mL を報告している。以上のことから，本研究で得られた定量結果は妥当な値であると考えられる。

PEG を物理的にコーティングしたカラムは，2 週間程度の使用では保持時間の大きな減少は認められなかったが，2 週間を超えて使用した際には徐々に保持時間が減少したことから，PEG のシリカゲルへの化学結合などによる耐久性の改善が望まれる。

3・1・3 ポリオキシエチレンオレイルエーテル固定相

PEG は C30 固定相に物理的にコーティングされているだけであり，上述のように比較的疎水性の低い PEG の C30 への吸着力は弱いことから分離カラムの耐久性に問題がある。ここでは，疎水性基であるオレイル基を有する界面活性剤であるポリオキシエチレンオレイルエーテル (POEOE) を固定相として適用可能かどうか検討した²⁴⁾。用いた POEOE は分子内に平均重合度 50 のポリオキシエチレン基を有しており，PEG 固定相と同様な機構で陰イオンが保持されることが期待された。

検討の結果，POEOE 固定相により陰イオンが保持され，検討した 4 種陰イオンの保持は $\text{IO}_3^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$ となり，PEG 固定相と同一順序となった。保持時間は，検討した溶離液（塩化アンモニウム，硫酸アンモニウム，塩化リチウム，塩化ナトリウム，塩化マグネシウム又は硫酸マグネシウム水溶液）すべてにおいて濃度の増加とともに

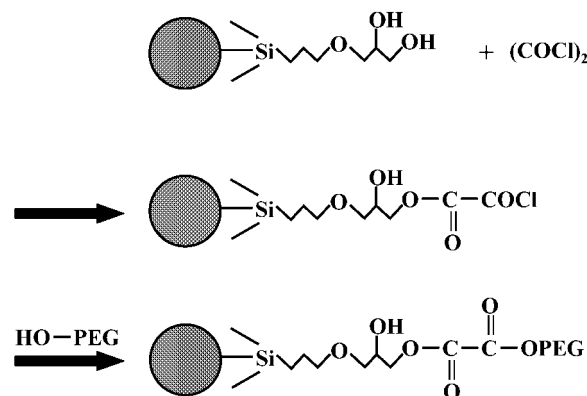


Fig. 4 Expected reaction between diol groups and PEG via oxalyl chloride

にヨウ化物イオンの保持が増大する傾向を示した。POEOE 固定相においても，溶離液陰イオンを同一とした場合，PEG 固定相と同様，水和力の強い陽イオンほどヨウ化物イオンの保持が増大する傾向を示した。300 mM の塩化ナトリウム水溶液を溶離液として用い，POEOE 固定相による海水中ヨウ化物イオンの定量に成功した²⁴⁾。

3・1・4 化学結合型 PEG 固定相 PEG 固定相の耐久性を改善するために 2・2・2 で述べたように，PEG をジオール基及び塩化オキサリルを介してシリカゲルに導入した。期待される反応スキームを Fig. 4 に示す。PEG は図に示したように，エステル結合によってシリカゲルに化学結合される。C30 固定相の場合にも同様にジオール基と塩化オキサリルを介してシリカゲルに化学結合させた。

平均分子量の異なる PEG3 種（1000，10000 及び 20000）について検討したところ，平均分子量 10000 の PEG 固定相が最も良い分離結果を与えることが分かった¹⁷⁾。この PEG 化学結合型カラムを用いて海水試料を分析したところ，ヨウ化物イオンとシステムピークが重なり定量ができなかったため，C30 基の共存下で PEG を導入したところ（以下化学結合型 PEG/C30 カラムと略記），システムピークの妨害がなくなり，微量ヨウ化物イオンの定量が可能となった。

化学結合型 PEG/C30 カラムについても試料陰イオンの保持挙動を検討した。結果を Fig. 5 に示す。表面修飾型 PEG 固定相と同様，ヨウ化物イオンの保持は溶離液の陰イオン及び陽イオンの種類によって影響を受け，検討した溶離液ではいずれも溶液の濃度の増加に伴って保持時間が増大した¹⁷⁾。また，水和力の強いイオンほどヨウ化物イオンの保持時間が大きくなる傾向を示した。これらの結果から，化学結合型 PEG/C30 固定相の場合にも濃度の高い溶離液の利用が有効であることが明らかになった。

Fig. 6 に，300 mM 硫酸ナトリウムと 50 mM 塩化ナトリウムの混合溶液を溶離液として用いた場合の海水中ヨウ

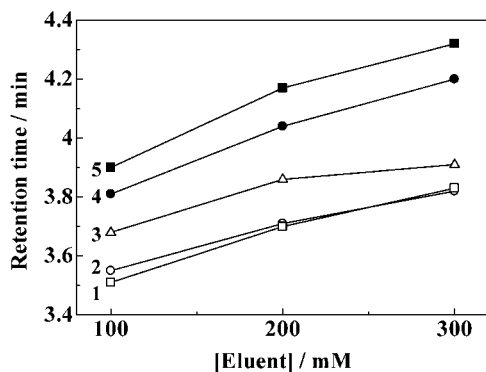


Fig. 5 Retention time of iodide as a function of the eluent concentration

Column : chemically-bonded PEG-10000/C30 binary stationary phase (100 × 0.32 mm I.D.); Eluent : 1 = sodium chloride, 2 = lithium chloride, 3 = ammonium chloride, 4 = sodium sulfate, 5 = ammonium sulfate ; Flow-rate : 2.1 $\mu\text{L min}^{-1}$; Analyte : iodide ; Injection volume : 0.2 μL ; Adapted from ref. 17 with permission from Elsevier.

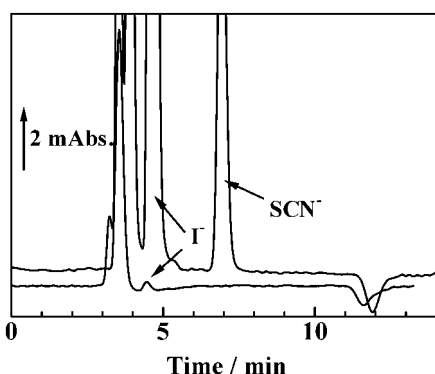


Fig. 6 Separation of authentic mixture of UV-absorbing anions and iodide in seawater sample on a chemically-bonded PEG/C30 binary phase using mixed 500 mM sodium sulfate and 50 mM sodium chloride as the eluent

Column : chemically-bonded PEG-10000/C30 binary column (100 × 0.32 mm I.D.); Eluent : 500 mM sodium sulfate and 50 mM sodium chloride ; Flow-rate : 2.1 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injection volume : 0.2 μL ; Wavelength of UV detection, 220 nm ; Samples : 0.2 mM each of iodate, nitrate, iodide and thiocyanate for the upper trace, seawater sample for the lower trace ; Reproduced from ref. 17 with permission from Elsevier.

化物イオンの分離検出例を示す。

化学結合型 PEG/C30 カラムは 2 か月間の使用に耐え、メタノールで洗浄しても保持が減少しなかったことから、PEG 相が化学的に結合されていると判断した。

3・2 陽イオン界面活性剤固定相

3・2・1 陽イオン界面活性剤のシリカゲルへの導入

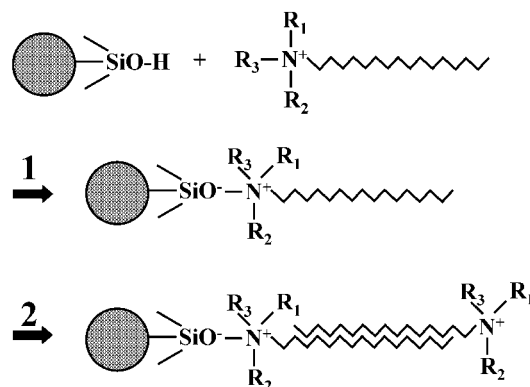


Fig. 7 Reaction between silica gel and quaternary ammonium surfactant

Fig. 7 にシリカゲルへの陽イオン界面活性剤の導入経路を示す。多孔性シリカゲルに陽イオン界面活性剤 (CTAB, CTAC 又は DDAB) を含む水溶液を通液すると、シラノール基と陽イオン界面活性剤の第 4 級アンモニウムイオンとが陽イオン交換して第一層目の陽イオン界面活性剤が導入され、引き続いて陽イオン界面活性剤の疎水性部位間に働く疎水性相互作用により第二層目の陽イオン界面活性剤が導入される。分析の際には第二層目の陽イオン界面活性剤の第 4 級アンモニウムが陰イオン交換サイトとして働く。この方法によって調製される固定相の性能は、ODS などの疎水性固定相への陽イオン界面活性剤の吸着によって調製される陰イオン交換カラムと類似している⁴⁾⁵⁾。本法は、シリカゲルに ODS 基などを導入するプロセスを省略できることからモノリス型シリカキャピラリーカラムの場合には簡便なカラム調製法となる。

3・2・2 モノリス型シリカキャピラリーカラム モノリス型シリカ系カラムは、その構造の特徴から高い透過性と高い分離能を両立できるカラムとして注目されている^{25)~30)}。コンベンショナルサイズのモノリス型シリカ ODS カラムに界面活性剤をコーティングしたカラムを利用したイオンクロマトグラフィーが研究され、迅速分離が報告されている⁴⁾。本研究ではモノリス型シリカキャピラリーカラムの特徴を生かすため、陽イオン界面活性剤を直接導入したシリカキャピラリーカラムを調製し、陰イオンの迅速分離を試みた¹⁸⁾¹⁹⁾。

内径 0.1 mm のモノリス型シリカキャピラリーカラムは、既報³¹⁾に従って調製した。調製されたモノリス型シリカキャピラリーカラムに CTAB 又は CTAC 水溶液を流量 0.69 $\mu\text{L/min}$ で通液して陰イオン交換カラムを調製した。界面活性剤の濃度及び通液時間を検討した結果、濃度 3 mM、通液時間 12 時間を最適とした¹⁸⁾。

Fig. 8 に長さ 40 cm のモノリス型シリカキャピラリーカラムによる陰イオンの分離検出例を示す¹⁸⁾。5 種陰イオン

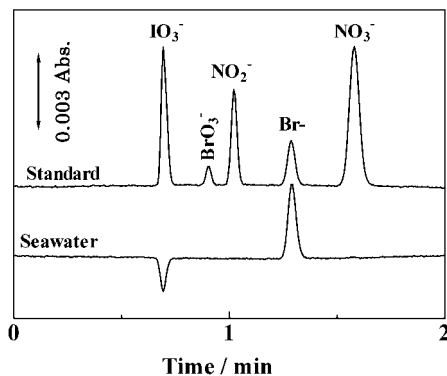


Fig. 8 Separation of authentic mixture of five anions and bromide in a seawater sample on a monolithic silica capillary column modified with cetyltrimethylammonium ion

Column : 400 × 0.1 mm I.D. ; Eluent, 500 mM sodium chloride containing 0.1 mM CTAC ; Flow-rate : 5.6 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injection volume : 20 nL ; Samples : 0.5 mM each for the upper trace, seawater for the lower trace ; Wavelength of UV detection : 210 nm ; Reproduced from ref. 18 with permission from Elsevier.

の分離が2分以内に達成されており、圧力損失は5.3 MPaであった。Fig. 8には海水中臭化物イオンの分離検出も示されており、短時間に臭化物イオンの分離定量が可能であることが分かる。

本法によって調製したモノリス型シリカキャピラリーカラムは、500 mMの高濃度の溶離液を用いても目的とする陰イオンの保持を十分大きく保つことができ、マトリックスイオンの妨害もなく海水中臭化物イオンの定量が可能となった。Fig. 8では、溶離液として0.1 mMのCTACを含む500 mM塩化ナトリウム水溶液を用いている。CTACを含まない溶離液を使用するとしだいに保持が減少したが、CTACを入れることで保持の安定性を大きく改善できた¹⁸⁾。

CTA イオンの代わりにジラウリルジメチルアンモニウム (DDA) イオンを用いると、疎水性相互作用がより強くなり、溶離液にDDA イオンを含まなくても試料イオンの保持を安定に保つことができた¹⁹⁾。Fig. 9に修飾剤としてDDA イオン及びCTA イオンを用いたときの保持の安定性を示した¹⁹⁾。後者の場合は保持が徐々に減少しているが、前者の場合には保持が安定していることが分かる。このことより、DDABを修飾剤として用いることにより界面活性剤のブリーディングの少ない固定相が調製できることが分かった。後者の場合でも、溶離液に0.1 mM程度のCTACを溶離液に添加しておけば保持は安定した。また、Fig. 9では両固定相で保持の大きさがかなり異なっており、DDA イオンを用いたときのほうが、CTA イオンを用いたときよりも多くの陰イオン交換基が存在することが分かった。

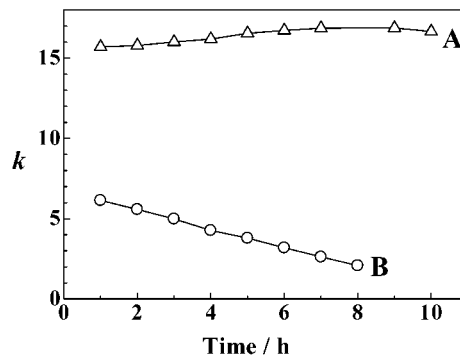


Fig. 9 Stability of monolithic silica capillary columns modified with dilauryldimethylammonium ion or cetyltrimethylammonium ion

Columns : monolithic silica capillary columns (200 × 0.1 mm I.D.) modified with a dilauryldimethylammonium ion (A) or a cetyltrimethylammonium ion (B); Eluent : aqueous solution of 50 mM sodium chloride (pH 5.8); Flow-rate : 2.1 $\mu\text{L min}^{-1}$; analyte ion, nitrate ; Injection volume : 20 nL ; Reproduced from ref. 19 with permission.

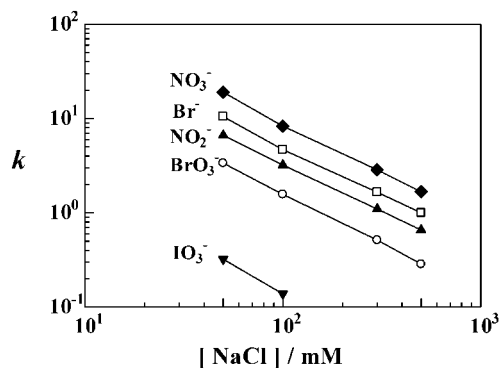


Fig. 10 Effects of the eluent concentration on the retention factor

Columns : monolithic silica capillary columns (200 × 0.1 mm I.D.) modified with a dilauryldimethylammonium ion ; Eluent : aqueous solution of sodium chloride ; Flow-rate : 2.1 $\mu\text{L min}^{-1}$; Reproduced from ref. 19 with permission.

本法で調製したキャピラリーカラムは、溶離液の濃度が増加すると保持が減少した。保持係数の対数を溶離液濃度の対数に対してプロットすると、Fig. 10のように直線関係が得られたことより、試料陰イオンはイオン交換の機構で保持されていることが示唆された。

Fig. 10において、修飾剤としてDDAB、溶離液として500 mM塩化ナトリウム水溶液を用いたときの臭化物イオンの検出限界 ($S/N=3$) は、1.6 $\mu\text{g/mL}$ 、また定量限界 ($S/N=10$) は5.3 $\mu\text{g/mL}$ であり、海水中の他の微量陰イオンの定量のためには濃度検出感度の改善が望まれる。

3・2・3 充填型シリカカラム 濃度感度の改善は、分

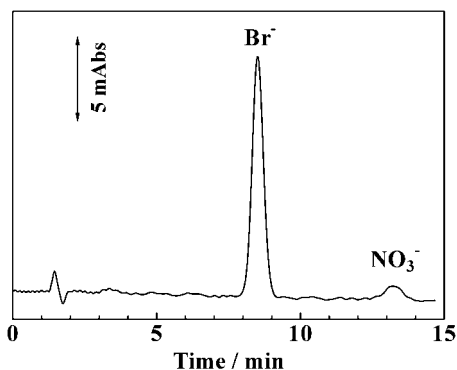


Fig. 11 Separation of bromide and nitrate in a seawater sample on a packed silica capillary column modified with DDAB

Column : 100×0.32 mm I.D. modified with DDAB ;
Eluent : 450 mM sodium chloride containing ; Flow-rate : $4.2 \mu\text{L min}^{-1}$; Injection volume : $0.2 \mu\text{L}$;
Sample : seawater ; Wavelength of UV detection : 210 nm

離カラムの内径を増加させ試料注入体積を増加させれば達成できる。ここでは、内径 0.32 mm の充填シリカキャピラリーカラムを調製し、DDAB を通液することにより陰イオン交換カラムを作製した。

粒子径 $5 \mu\text{m}$ の多孔性シリカゲルキャピラリーカラム (100×0.32 mm) に濃度 4 mM の DDAB 水溶液を流量 $4.2 \mu\text{L/min}$ で 200 分間通液して陰イオン交換カラムを調製した。このカラムの場合、 $0.2 \mu\text{L}$ の試料量を注入できるため、モノリス型シリカキャピラリーカラムより濃度感度の改善を期待することができる。Fig. 11 に内径 0.32 mm のカラムによる海水試料の分離検出例を示す³²⁾。標準試料イオンと保持時間の一致する臭化物イオンと硝酸イオンの検出を確認し、標準添加法により定量を行ったところ、臭化物イオンは 0.77 mM ($62 \mu\text{g/mL}$)、また、硝酸イオンは $8.2 \mu\text{M}$ ($0.51 \mu\text{g/mL}$) と定量された。なお、Fig. 11 の条件下での臭化物イオン及び硝酸イオンの検出限界 ($S/N=3$) は $6.3 \mu\text{M}$ ($0.50 \mu\text{g/mL}$)、 $2.1 \mu\text{M}$ ($0.13 \mu\text{g/mL}$) であり、モノリス型シリカキャピラリーカラムの場合と比較して 3 倍程度の濃度感度の改善を見た。

更に濃度感度を改善するために、コンベンショナルサイズ (内径 4.6 mm) のシリカゲルカラムを調製し、海水試料への応用を検討した。

上述と同様、内径 4.6 mm のシリカゲルカラムに濃度 12 mM の CTAB を流量 1.0 mL/min で 20~50 時間通液し、陰イオン交換カラムを調製した。ここでは、平均粒子径 $4.4 \mu\text{m}$ 、比表面積 $356 \text{ m}^2/\text{g}$ 、細孔容積 1.06 mL/g のシリカゲルを使用した。

Fig. 12 に標準試料 (各濃度 0.5 mM) 及び海水試料のクロマトグラムを示した³³⁾。海水試料は、メンブランフィルターで濾過後、 $20 \mu\text{L}$ 注入した。なお、図中海水のクロマ

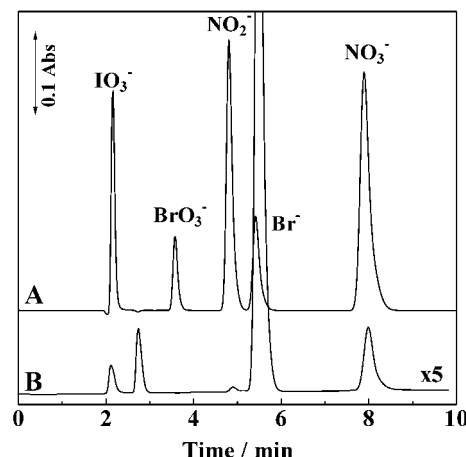


Fig. 12 Separation of authentic mixture of five anions as well as nitrite, bromide and nitrate in a seawater sample on the silica column modified with cetyltrimethylammonium ion

Column : conventional silica column modified with CTAB (150×4.6 mm I.D.); Eluent : mixed 50 mM sodium chloride and 70 mM sodium sulfate aqueous solution added with 0.1 mM CTAC ; Flow-rate : 1.0 mL min^{-1} ; Wavelength of UV detection : 210 nm ;
Analytes : 0.5 mM each for the upper trace, seawater for the lower trace ; Injection volume : $20 \mu\text{L}$

トグラムは 5 倍に拡大して表示されており、臭化物イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンのピークのほかに 2 本ピークが出現していることが分かる。3 分弱に溶出しているピークは塩化物イオンの保持時間と一致し、これは海水と分離液の濃度差に基づいて現れるシステムピークであることが分かった。また、2 分近くのピークはヨウ素酸イオンの保持時間に一致するが、保持がほとんどないため他の成分も含まれる可能性があり、本研究では定量は行わなかった。Fig. 12 の海水中微量陰イオンは、絶対検量線法により、亜硝酸イオン $1.7 \mu\text{M}$ ($0.078 \mu\text{g/mL}$)、臭化物イオン 0.75 mM ($60 \mu\text{g/mL}$)、硝酸イオン $27 \mu\text{M}$ ($1.7 \mu\text{g/mL}$) と定量された。

Fig. 12 の条件下で、連続 6 回測定を行った際の再現性は、ピーク高さ、ピーク面積並びに保持時間について 4.7% (相対標準偏差, RSD) 以下であった。また、臭化物イオン、硝酸イオン及び亜硝酸イオンの検出限界 ($S/N=3$) は、それぞれ $0.26 \mu\text{M}$ (21 ng/mL)、 $0.11 \mu\text{M}$ (6.8 ng/mL)、 $0.10 \mu\text{M}$ (4.6 ng/mL) であった。

Table 2 にカラムサイズの違いによる検出感度の差異を比較した³²⁾³³⁾。Table 2 において、試料注入体積はモノリス型シリカキャピラリーカラム (内径 0.10 mm) の場合は $0.02 \mu\text{L}$ 、充填型シリカキャピラリーカラム (内径 0.32 mm) の場合は $0.2 \mu\text{L}$ 、コンベンショナルサイズシリカカラム (内径 4.6 mm) の場合は $20 \mu\text{L}$ である。また、Table 2 には紫外検出器フローセルの光路長を比較した。モノリス

Table 2 Comparison of the detection limits and operating conditions

Parameter		Column size/mm		
		200 × 0.10	100 × 0.32	150 × 4.6
Detection limits at $S/N = 3$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bromide	1.6	0.50	0.021
	Nitrate	0.43	0.13	0.0068
	Nitrite	0.47	0.087	0.0046
Injection volume/ μL		0.02	0.2	20
Pathlength of flow cell/mm		0.1	0.35	10

型キャピラリーカラムはデッドボリウムの影響を避けるためにオンカラム検出を行った。表から分かるように、コンベンショナルサイズのカラムを用いることで充填キャピラリーカラムより数10倍、またモノリス型シリカキャピラリーカラムと比較して2桁^{けた}の濃度検出感度の改善を達成することができた。本研究で達成された検出限界の値は、これまでに紫外検出器を用いて報告されている値とほぼ同じレベルにある。

4 結 論

本研究で開発したPEG固定相を用いることにより、マトリックスの影響を受けることなく海水中ヨウ化物イオン及びチオシアン酸イオンを定量することに成功した。また、PEG固定相を化学結合することにより耐久性の改善につながった。更に、疎水性長鎖アルキル基を有する第4級アンモニウムイオンをシリカゲルに導入した固定相を用いることにより、海水中臭化物イオン、亜硝酸イオン及び硝酸イオンが定量できた。本研究では、紫外吸収のある海水中陰イオンに対して ng/mL レベルの検出感度を達成したが、今後は、海水中紫外吸収のない微量イオンの定量法の開発が課題である。

文 献

- 1) K. Ito : *J. Chromatogr. A*, **830**, 211 (1999).
- 2) M. Maruo, T. Doi, H. Obata : *Anal. Sci.*, **22**, 1175 (2006).
- 3) 中村栄子, 井上順子, 並木 博 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 711 (1996).
- 4) K. Ito, Y. Takayama, N. Makabe, R. Mitsui, T. Hirokawa : *J. Chromatogr. A*, **1083**, 63 (2005).
- 5) K. Ito, T. Hirokawa : *Anal. Sci.*, **17**, 579 (2001).
- 6) Y. Huang, S.-F. Mou, K.-N. Liu, J. M. Riviello : *J. Chromatogr. A*, **884**, 53 (2000).
- 7) W. Hu, P.-J. Yang, K. Hasebe, P. R. Haddad, K. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **956**, 103 (2002).
- 8) A. Sakuragawa, S. Nakayama, T. Okutani : *Anal. Sci.*, **10**, 77 (1994).
- 9) K. Oguma, K. Kitada, R. Kuroda : *Mikrochim. Acta*, **110**, 71 (1993).
- 10) Z. Huang, K. Ito, T. Hirokawa : *J. Chromatogr. A*, **1055**, 229 (2004).
- 11) Z. Huang, K. Ito, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa : *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1836 (2004).
- 12) K. Fukushi, N. Ishio, H. Urayama, S. Takeda, S. Wakida, K. Hiroyo : *Electrophoresis*, **21**, 388 (2000).
- 13) J. P. Martins, C. P. Carvalho, L. H. M. Silva, J. S. R. Coimbra, M. C. H. Silva, G. D. Rodrigues, L. A. Minim : *J. Chem. Eng. Data*, **53**, 238 (2008).
- 14) T. Takeuchi, E. S. Yeung : *J. Chromatogr.*, **370**, 83 (1986).
- 15) L. Rong, T. Takeuchi : *J. Chromatogr. A*, **1042**, 131 (2004).
- 16) L. Rong, L. W. Lim, T. Takeuchi : *Chromatographia*, **61**, 371 (2005).
- 17) L. Rong, L. W. Lim, T. Takeuchi : *J. Chromatogr. A*, **1128**, 68 (2006).
- 18) A. Suzuki, L. W. Lim, T. Hiroi, T. Takeuchi : *Talanta*, **70**, 190 (2006).
- 19) A. Suzuki, L. W. Lim, T. Takeuchi : *Anal. Sci.*, **23**, 1801 (2007).
- 20) F. Hofmeister : *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. (Leipzig)*, **24**, 247 (1888).
- 21) E. Leontidis : *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.*, **7**, 81 (2002).
- 22) V. W. Truesdale, D. S. Danielssen, T. J. Waite : *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences*, **57**, 701 (2003).
- 23) S. Chandramouleeswaran, B. Vijayalakshmi, S. Kartihkeyan, T. P. Rao, C. S. P. Iyer : *Mikrochim. Acta*, **128**, 75 (1998).
- 24) L. Rong, L. W. Lim, T. Takeuchi : *Talanta*, **72**, 1625 (2007).
- 25) N. Tanaka, H. Kobayashi, H. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka : *Anal. Chem.*, **73**, 420A (2001).
- 26) N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Cabrera, D. Lubda : *J. High Resolut. Chromatogr.*, **23**, 111 (2000).
- 27) C. Fujimoto : *J. High Resolut. Chromatogr.*, **23**, 89 (2000).
- 28) N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka : *Anal. Chem.*, **72**, 1275 (2000).
- 29) J. D. Hayes, A. Malik : *Anal. Chem.*, **72**, 4090 (2000).
- 30) M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **961**, 53 (2002).
- 31) T. Takeuchi, S. Tatsumi, S. Masuoka, K. Hirose, H. Uzu, J.-Y. Jin, C. Fujimoto, K. Ohta, K.-P. Lee, J.-J. Ryoo, S.-H. Choi : *J. Chromatogr. A*, **55**, 1021 (2003).
- 32) M. Kobayashi, L. W. Lim, T. Takeuchi : unpublished data.
- 33) X.-L. Jiang, L. W. Lim, T. Takeuchi : unpublished data.

Development of Novel Stationary Phases for Ion Chromatographic Determination of Trace Inorganic Anions in Seawater

Xiao-Lin JIANG¹, Li RONG¹, Atsushi SUZUKI¹, Masahiro KOBAYASHI¹,
Lee Wah LIM¹ and Toyohide TAKEUCHI¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1, Yanagido, Gifu-shi, Gifu 501-1193

(Received 11 July 2008, Accepted 28 August 2008)

Novel stationary phases for the determination of inorganic anions in seawater have been developed in ion chromatography. Stationary phases, which allow the use of high-concentration eluents, have been examined in order to avoid the effects of matrix ions contained in seawater. The retention of analyte anions increased with increasing eluent concentration for poly (ethylene glycol) stationary phases, which was advantageous to determine trace iodide and thiocyanate in seawater samples. Quaternary ammonium surfactants could be directly introduced onto silica gel via ion exchange, followed by hydrophobic interaction. These stationary phases also allowed us to use high-concentration eluents for the determination of nitrate, bromide and nitrite in seawater samples. The use of conventional-size columns with 4.6 mm I.D. improved the concentration sensitivity, and achieved detection limits at ng/mL levels.

Keywords : Ion chromatography ; stationary phases ; determination ; inorganic anions ; seawater.