

9113 海水中の微量無機陰イオンのイオンクロマトグラフィーに関する研究

六鹿 宗治(京都大学)

1. 研究目的

海水のように高濃度の塩をマトリックスとして含む溶液中の微量陰イオンの分析は重要であるが、従来用いられている低交換容量のイオン交換体カラムによるイオンクロマトグラフィーでは試料の直接注入は困難である。これまでは試料を希釈するかあるいは前処理でマトリックスイオンを除去しているが、目的イオンが微量の場合には感度が不足したり前処理による汚染が問題となっている。本研究では高濃度のマトリックスイオンを含む試料の直接注入によって高感度で陰イオンの迅速分析が行えるイオンクロマトグラフィーの系を開発することを目的としている。

2. 研究方法と結果

i)陰イオン交換カラムによる方法

通常イオンクロマトグラフィーで用いられる溶離液では、試料のマトリックスイオンがカラムの交換容量以上に導入されるのでカラム内のイオン交換平衡が極端に乱され目的とするイオンの分離が不可能となる。そこでカラムのイオン形をマトリックスイオンすなわち海水では塩化物イオン形とし、溶離液も塩化物塩を用いると見かけ上試料中のマトリックスがカラムに保持されず排除されるが他のイオンはそれぞれ保持され分離できる。この方法で海水とほぼ濃度の等しい2% 塩化ナトリウム溶液中の臭素酸、臭化物、硝酸及び亜硝酸の各イオンがppb からサブppb のレベルでそれぞれ分離、検出できた。

ii)逆相分配クロマトグラフィー用カラムによる方法

次に炭酸および亜硝酸が酸性溶離液を用いると疎水性の逆相分配クロマトグラフィー用カラムに保持されることを見いだした。特に酸性で安定なポリ(ビニルアルコール)ゲルを基材として疎水基を結合したAsahipak ODP-50 カラムが有用であった。溶離液として1~10 mN 硫酸を用い、カラムの溶出液を中空イオン交換膜と中性または塩基性のエンハンサーによってpHを中性から塩基性にすることで電気伝導度計及び紫外吸収計の感度を増感した。本法によって2% 塩化ナトリウム溶液に添加した炭酸の検量線を両対数でプロットしたとき直線範囲は0.1 ~20 μg であった。また海水に添加した亜硝酸は2 ng~2 μg の範囲で直線関係がみられた。

内径0.53 mm のミクロカラムを電気化学検出器に接続して0.5 ppm の亜硝酸を添加した海水を4 分毎に繰り返し注入して良好な再現性が得られることを示した。この検出法での亜硝酸の検出限界は約2.5 pg (NO_2^- として60 fmole)であった。

9113 海水中の微量無機陰イオンのイオンクロマトグラフィーに関する研究

六鹿 宗治(京都大学)

1. 研究目的

海中または河口付近における海老や魚類の養殖漁業において、水槽や養殖池の海水中の代謝産物や飼料による汚染状況を知り、環境の適切な管理を行うことは生物の正常な発育にとって、極めて重要である。特に窒素含有化合物であるアンモニアやその酸化物である亜硝酸及び硝酸はいずれも毒性が高く正確で迅速な微量定量が要求される。しかし、現在では煩雑な手法による手分析に頼って化学的に発色させた後比色法が用いられているが、手数がかかり、精度も悪いために機器分析の適用が待たれている。

特に検出、定量の面倒な硝酸と亜硝酸の微量定量法の開発は水産養殖にとってきわめて重要な問題であると考えられる。これら生物活性に伴って生成する陰イオンである亜硝酸イオンは鹹水中での各種魚介類に対する致死濃度 LC_{50} は比較的高いが、血液中のヘム鉄と結合することによってメトヘモグロビンを生じるために、水中に低いレベルのppm濃度でも亜硝酸が溶存すると体内において、血液の酸素輸送能が低下して、稚魚の成長を阻害することが知られている。

養殖場において、水質管理のために現在は手分析で複雑な操作法による硝酸と亜硝酸の分別定量を行っている。しかしこの方法では、定量感度、精度ともに不十分であり、多大の労力と時間を費やしている。これに対して、水溶液中に極めて低濃度で存在する種々のイオン種の超高感度分析法としてイオンクロマトグラフィーは急速に発展してきた。本法は特に希薄溶液においては無機陰イオンをppt (10^{-12}) レベルの極めて低い濃度でも分析し得るものである。しかし、海水に見られるように濃厚な塩溶液中に存在するppm濃度の無機イオンが重要な働きを示す場合には現在用いられているシステムによるイオンクロマトグラフィーでは高濃度に存在するマトリックスイオンによる妨害のため十分な分離定量が不可能である。

本研究においてはイオンクロマトグラフィーによる海水中のppbからpptに至るレベルでの亜硝酸の正確で、かつ1検体5分前後の迅速分析法を開発し、完全な自動分析を可能とすることにより水産養殖場における水質管理に利用することを目的としている。

本法はまた、食品の添加物としての亜硝酸あるいは硝酸の微量分析にも応用が可能であ

る。これらの塩は発色剤としてハム、ソーセージあるいはたらこ等の食品に添加されているが抽出液は食塩の濃度が高く、クロマトグラフィーによる分析を妨害している。更に濃厚溶液中の微量分析法の応用としては、例えば化学薬品あるいは反応生成物としての塩化物、硝酸または硫酸などの塩に不純物として含まれる微量イオンの迅速分析法としても極めて有用であると考えられる。

2. 研究方法

海水中の塩化物イオンの濃度は2%程度存在するため従来のイオンクロマトグラフィーではマトリックスイオンによって妨害を受けppm-ppb レベルの陰イオンは分析することができない。すでにリサイクル法による亜硝酸の分析法を発表したが分析に時間と手間がかかり、感度にも問題があったので新しい方法として2種類の方法を開発した。

最初に紫外吸収を示すイオンを対象として、陰イオン交換体カラムをマトリックスイオンと同じ $Q\bar{L}$ -型として溶離液にも塩化物イオンを用いることによってマトリックスイオンを見かけ上カラムに保持されないようにして選択的に追い出し、目的イオンは保持し、相互に分離させることに成功した。

第2の方法は、対象を炭酸イオンと亜硝酸イオンとに限り、ポリビニルアルコールを基材とした逆相分配用カラムに硫酸酸性の溶離液を用いることによって無機陰イオンを排除し、炭酸と亜硝酸を選択的に吸着させる方法を見いだした。この場合にはサプレッサーとして装備されているスルホン酸を交換基として有する中空陽イオン交換膜の内部に溶離液を、外部にエンハンサーとして50 mN-硫酸ナトリウム溶液または $NaOH + Na_2SO_4$ 溶液を用いた。

装置及び試薬

横河電機製イオンクロマトグラフィックアナライザー I C100型に耐アルカリ性の高い中空イオン交換膜型サプレッサーを付けた。紫外吸収計は日立製作所製波長可変UV検出器UV638型を接続した。温度は $40 \pm 0.1^\circ C$ に調節した。ピークの面積は島津製作所製クロマトパックC-R1A型によって測定した。電気化学検出には柳本製VMD-3200型検出器にEicom CB 100型フローセルを用いた。

カラムには横河SAM 3-125 (4.9 mm X 125 mm)及びAsahipak PVA basege あるいはODP-5 (150 mm X 4.6 cm, 粒子径5 μm)を用いた。

炭酸の定量には溶離液中にとけ込んでいる炭酸の影響を除くために十分注意を払った。すなわち、新鮮な超純水を用いて溶離液を調製し、ヘリウムガスを通して脱気した後、溶媒溜とポンプとの間にPTFEチューブを耐圧容器にいれ、真空ポンプで減圧した手製の連続脱気装置（デガッサー）を接続した。

試薬類はナカライテスク（京都市）及び和光純薬（大阪市）製を用いた。超純水はイオン交換水を原水として、Nanopure (Barnstead, U. S. A.)によって調製した。

3. 研究結果と考察

3. 1. 陰イオン交換カラムによる方法

3. 1. 1. 原理

通常イオンクロマトグラフィーにおいては陰イオンの分析には $10-100\mu$ 等量/ml程度の低いイオン交換容量の陰イオン交換カラムを用いる。このカラムに薄い炭酸ナトリウムを溶離液として用いると、大量のマトリックスイオンが存在する試料に対してはカラムが飽和状態となるので低濃度の目的イオンの分析が不可能である。そこでカラムのイオン型をマトリックスイオンと同じにして溶離液中の陰イオンもマトリックスイオンとする方法を開発した。本法によれば試料中に大量に存在するマトリックスイオンは見かけ上カラムに全く保持されないで溶出する。一方マトリックスイオンよりも選択性の大きいイオンは保持され相互に分離される。海水を対象とする場合にはマトリックスイオンは塩化物イオンであるので溶離液はKClまたはNaClとしてカラムを十分平衡化させた。

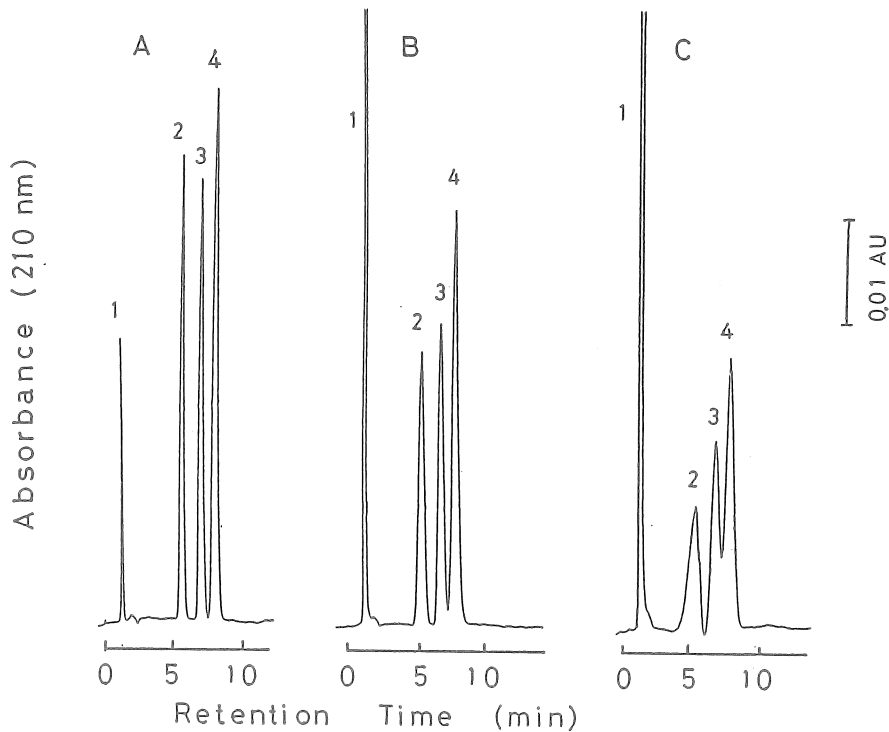


図 1. 塩化物イオンをマトリックスとして含む陰イオンのクロマトグラフィー。試料中の塩化物イオン濃度とピーク形状の関係。

塩化物イオン濃度：A = 5 mg/ml, B = 20 mg/ml, C = 50 mg/ml、ピーク：1 = Cl^- 、2 = NO_2^- (1 $\mu\text{g/ml}$)、3 = Br^- (5 $\mu\text{g/ml}$)、4 = NO_3^- (1 $\mu\text{g/ml}$)、カラム：横河PAM 3-035 (4.6 mm x 30 mm)ガードカラム、SAM 3-125 (4.9 mm X 125 mm) 分析カラム、試料体積：50 μl 、溶離液：50 mN 塩化カリウム溶液、流速：1.5 ml/min、カラム温度：40 $^\circ\text{C}$ 、検出：210 nm。

3. 1. 2. 結果

検出に紫外外部吸収計を、試料として亜硝酸、硝酸および臭化物イオンを用いた。種々の濃度の塩化ナトリウムを添加してそれぞれ50 μ lを注入した時のクロマトグラムを図1に示す。溶離液には50 mMの塩化カリウムを1.5 ml/minの流速で流した。いずれの場合でもCl⁻はクロマトグラムの最初に鋭いピークとして溶出している。塩化物イオンマトリックス濃度が5 mg/ml (5000 ppm)以下ではピークの形状に変化がなく分離は良好であった。塩化物イオン濃度を増すとピーク幅の増大が観測された。20 mg/ml でも幅は広がるが良好な分離状態であった。さらに塩化物イオン濃度を高く50 mg/ml にするとBr⁻ピークとNO₃⁻ピークとの分離が悪くなるが面積の定量性は保たれていた。

図2は本法によって海水を分析した例である。クロマトグラムAは京都大学付属白浜水族館の水槽より採水した海水である。Cl⁻は鋭いピークとして溶出し、従来のイオンクロマトグラフィーによる直接導入ではCl⁻ピークと分離できなかったBr⁻は完全に分離定量が可能となった。かなり高濃度でNO₃⁻が検出された。この試料に0.5 μ g/ml(0.5 ppm)の亜硝酸を添加した試料のクロマトグラムがBである。

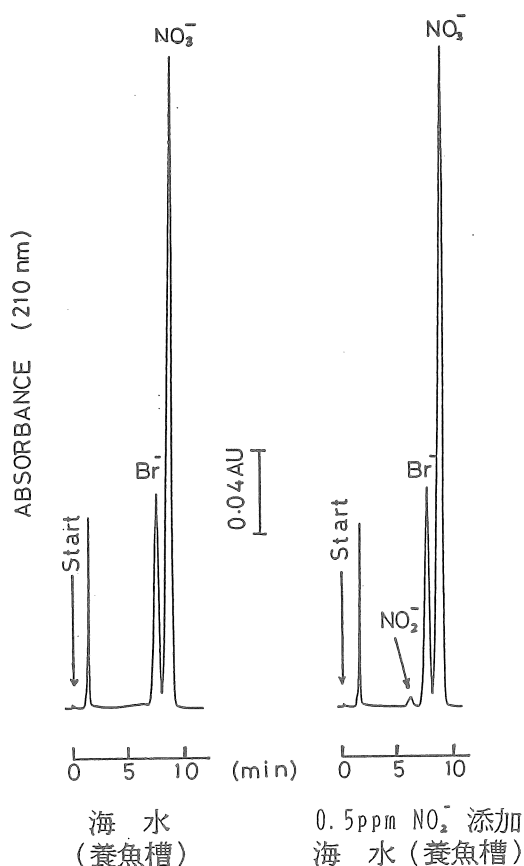


図 2. 海水の陰イオン交換カラムによるクロマトグラム。

A ; 水槽から採水した海水

B ; A に亜硝酸を0.5 μ g/ml 添加した試料

他の条件は図1に同じ。

3. 2. 逆相分配クロマトグラフィー用カラムによる分離法

3. 2. 1. 原理

逆相分配クロマトグラフィー用のカラムは疎水性であるが、酸性溶離液で非解離状態の亜硝酸及び炭酸の保持があることを見いだした。カラムから溶出後、サプレッサーとして接続されている中空イオン交換膜の外部に中性またはアルカリ性溶液をエンハンサーとして流した。この方法によって溶出液中の炭酸及び亜硝酸の解離を促進させることができるので、特に電気伝導度計の感度を数十倍に増感する事ができる。図3に中空イオン交換膜によるエンハンサーの原理を示す。

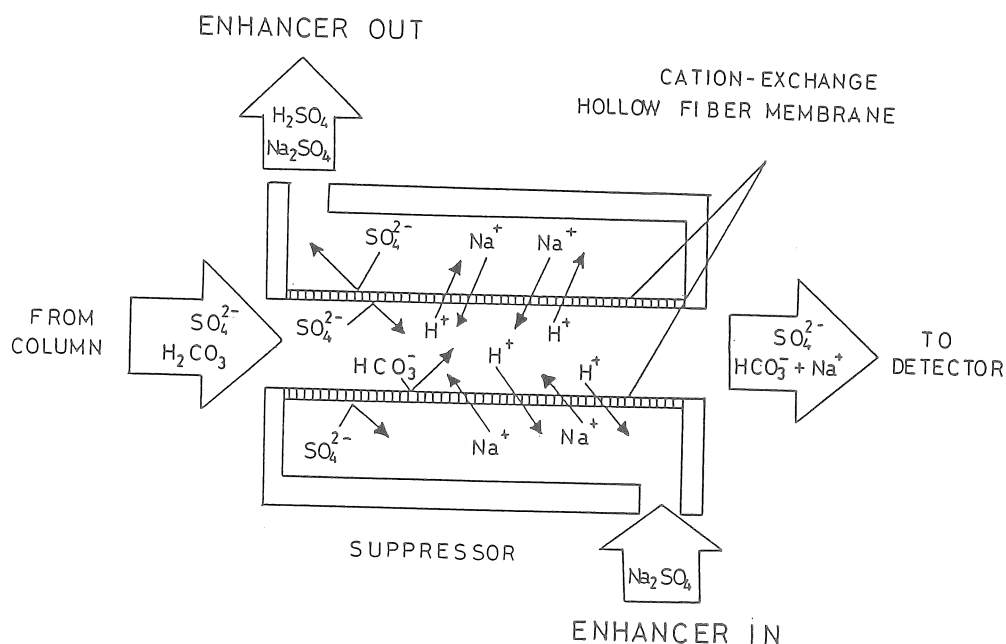


図3. 中空イオン交換膜によるエンハンサーの原理図

3. 2. 2. 結果

(i) 陰イオンの逆相カラムに対する保持

本実験では広いpH範囲で安定な逆相分配用カラムとしてポリビニルアルコールを基材としたAsahipak PVA ゲルカラムおよびこれに疎水性基を導入したAsahipak ODP-50 カラムを用いた。まずAsahipak PVA カラムに硫酸を溶離液として紫外吸収を有する4種類の陰イオンの挙動を調べたところ、図4に示すように良好な分離が得られた。この原因はゲル基材に僅かに含まれているアンモニウム性の窒素によるイオン交換能が働いているものと考えられる。しかし溶質の挙動と溶離液濃度(pH)との関係を検討するとpHが低くなるに従って他のイオンとの分離度が大きくなることがみられた。

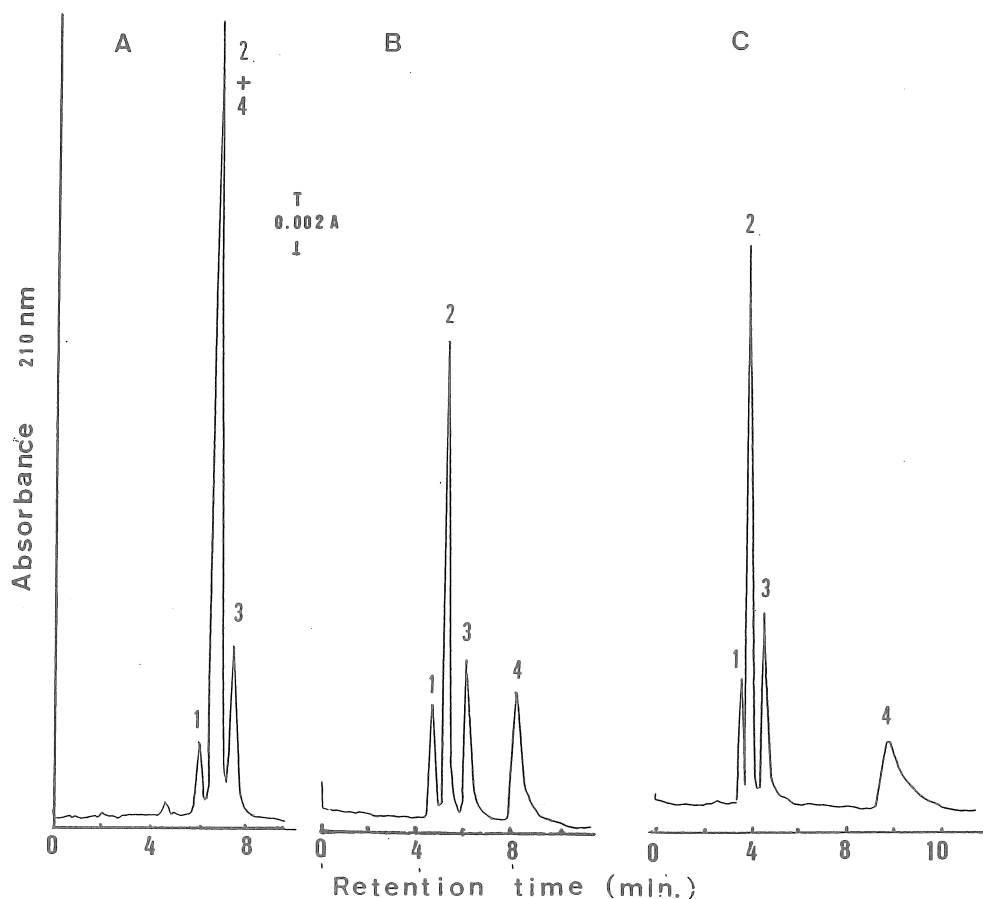


図 4. ポリビニルアルコールカラムによる陰イオンクロマトグラフィーの溶離液 pH の影響。

カラム : Asahipak PVA (4.6 mm X 15 cm)、温度 : 40°C、溶離液 : 硫酸 ; A = 0.05 mM, B = 0.5 mM, C = 2.5 mM、流速 : 0.7 ml/min、ピーク : 1 = 臭素酸 (3 ppm), 2 = 臭素 (1.7 ppm), 3 = 硝酸 (0.3 ppm), 4 = 亜硝酸 (2 ppm)。

亜硝酸の解離定数 pK_a が 3.15 であることを考慮すると溶離液の pH が高く NO_2^- イオンの場合には保持が弱く、低い pH 領域では中性型となって保持されていることが分かった。従って硫酸溶離液の濃度が高く pH が低い領域で亜硝酸は特異的に保持が認められるので他のイオンがマトリックスイオンとして高濃度に存在しても十分分離できることが期待できる。そこでこのゲルに疎水基としてオクタデシル基を導入した Asahipak ODP-50 カラムを検討したところこの傾向はさらにはっきりとし、亜硝酸はより鋭いピークを与えたので本カラムを用いて実験を行った。

(ii) エンハンサーの炭酸及び亜硝酸の検出感度に対する効果。

本法を用いたクロマトグラフィーでは酸性溶離液を用いているので炭酸は解離状態には

なく、解離状態のイオンにのみ応答する電気伝導度計での検出は困難である。この問題は中性または塩基性のサプレッサーを用い溶出液のpHを高くして二酸化炭素を炭酸イオンに変換する事によって初めて感度よく検出することができた。この場合でも溶離液濃度の影響は大きく濃度の上昇に従って感度は著しく低下した。50 mNの硫酸ナトリウムをエンハンサーとして用いたときの様子を図5に示している。高濃度の硫酸溶離液による感度の低下の理由については次の3点が考えられる。最初にはエンハンサーによるpHの補正が不十分であったこと、第2には溶出液のpHがエンハンサーによって中性になったとしても元々硫酸イオン濃度が高いため最終の塩濃度が高くなり、炭酸の解離が抑えられていると考えることができる。さらに中性の二酸化炭素として溶出した分子の一部がイオン化する前にイオン交換膜を通過したものと思われる。

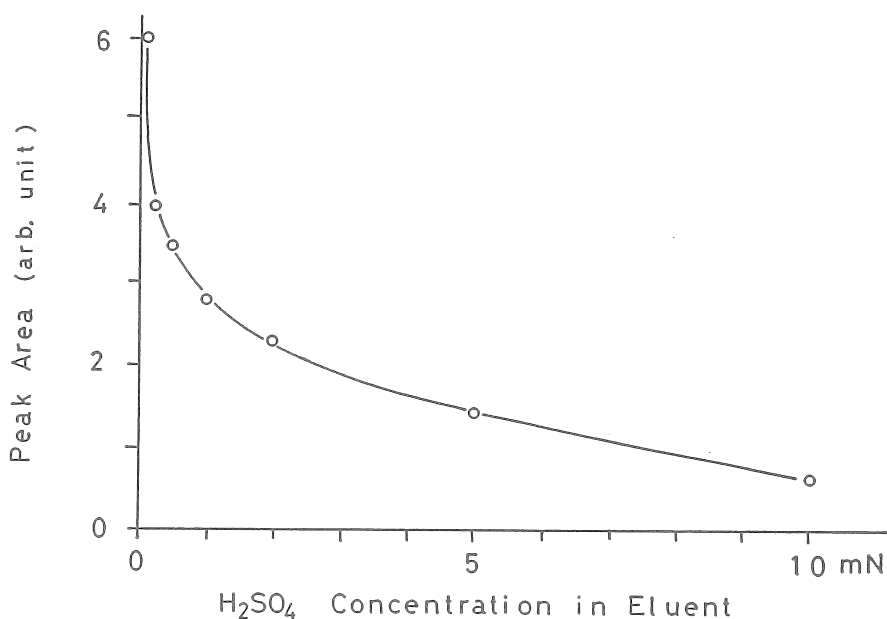


図 5. 炭酸のピーク面積と溶離液濃度の関係。

エンハンサー：50 mN 硫酸ナトリウム

エンハンサーによる増感効果は紫外吸収測定による亜硝酸の定量においても効果的であった。亜硝酸の解離定数は $pK_a = 3.15$ であるから溶出液中では大部分中性分子として存在している。亜硝酸の紫外吸収スペクトルは解離状態では210 nm付近に吸収極大を示すが非解離状態になると吸収が大きく減少すると共に極大値が短波長側へと移動するので、エンハンサーによってpHを上昇させると検出感度が増大される。エンハンサーとして50 mN硫酸ナトリウムを用いた場合の溶離液濃度と感度との関係を図6に示す。エンハンサーを用いても亜硝酸の感度も炭酸の場合ほどではないが溶離液濃度に幾分影響を受けることが観察された。

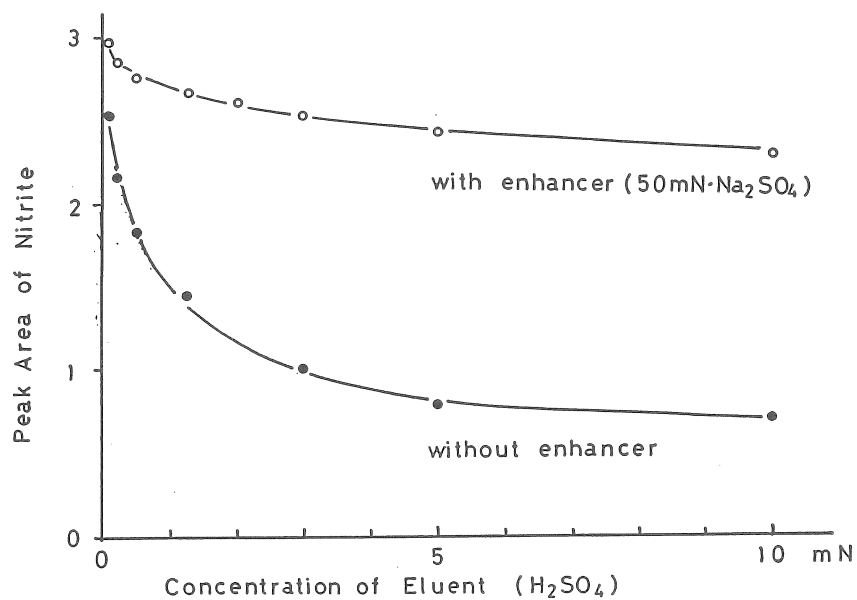


図 6。亜硝酸の紫外吸収計による検出感度に対するエンハンサーの効果と溶離液濃度の関係。

(iii) 標準曲線

エンハンサーとして中性塩及びアルカリ性溶液を用いて炭酸の標準曲線を両対数目盛りで図7に示す。いずれのエンハンサーでも0.1 μg以上の範囲で直線関係が得られた。

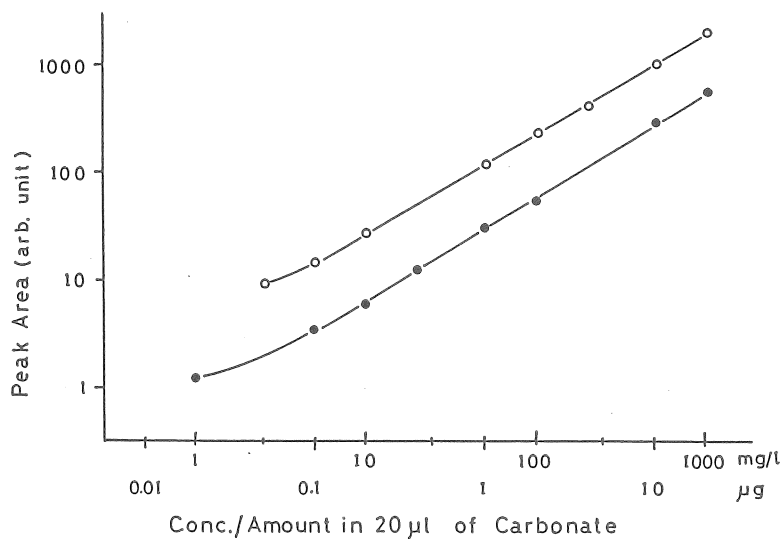


図 7。炭酸の標準曲線

検出：電気伝導度、エンハンサー：○；0.4 M NaOH + 2 N Na₂SO₄，●；50 mN Na₂SO₄。

アルカリをエンハンサーとして用いるとバックグラウンドが高くなり、ピークは負ピークとして現れる。この現象は、強い塩基性のエンハンサーによって溶出液のpHが急速に引き上げられ炭酸の解離は促進されるが等量電気伝導度のより大きいOH⁻イオンの負ピークとの差引としてバックグラウンド上の負ピークとなって現れると説明できる。ピーク面積は中性のエンハンサーと比べて約3倍大きくなるがS/N比は改善されないため検出感度としてはいずれのエンハンサーでも同程度であった。炭酸ではピーク面積と試料量との関係は直線ではないが、上の図の如く対数プロットで直線となりその関係はピーク面積をA、試料量をCとすると $A = B C^{0.95}$ で表された。ここでBは定数である。

亜硝酸を紫外吸収計で測定した場合ピーク面積-試料量の標準曲線は亜硝酸をNO₂として2 ng から2 μg の範囲で直線関係が得られた。

(iv) 逆相分配カラム上での亜硝酸と炭酸のクロマトグラム。

太平洋の海水に0.15 ppm の亜硝酸を添加して分析したクロマトグラムの例が図8である。2種類の検出器を用いて炭酸と亜硝酸を測定している。両者のピークの分離は良好であったが、この条件下で亜硝酸は電気伝導度計では検出されなかった。この試料に含まれていた炭酸濃度は123 ppm であった。

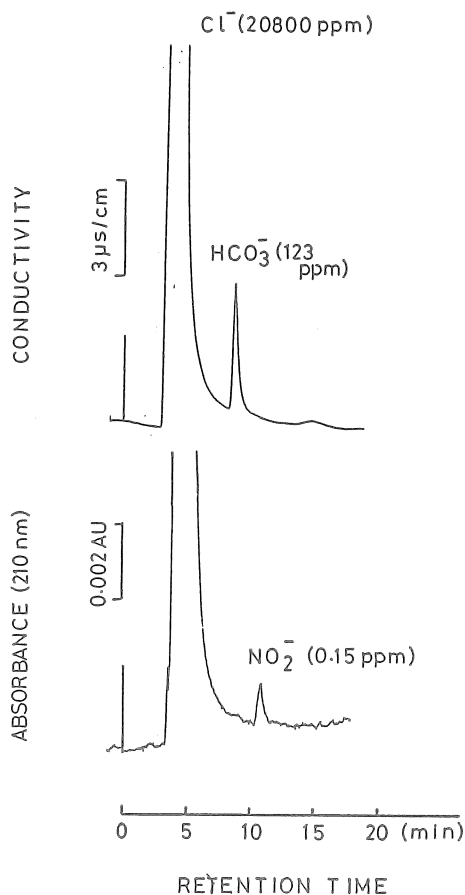


図 8。 海水中の炭酸と亜硝酸のクロマトグラム。

カラム : Asahipak ODP-50

(4.6 mm X 15 cm)

試料 : 海水に0.15 ppm の亜硝酸を添加

試料量 : 20 μl

温度 : 40 °C

溶離液 : 1.5 mN H₂SO₄

エンハンサー : 50 mN Na₂SO₄

検出 : 電気伝導度 (上)、紫外吸収 (下)

(V) ミクロカラムと電気化学検出による亜硝酸の高感度連続分析。

海中の亜硝酸を迅速に分析するために内径0.53 mm 長さ75 mm のミクロカラムにAsahipak ODP-50 を充填したカラムを調製した。検出には亜硝酸に高感度で応答する電気化学検出器を用いカラムに直接接続した。この方法の検出限界は約5 ppb (2.5 pg または NO_2^- として60 fmole)であった。0.5 ppm 亜硝酸を添加した海水を4分毎に繰り返し注入した結果を図9に示す。

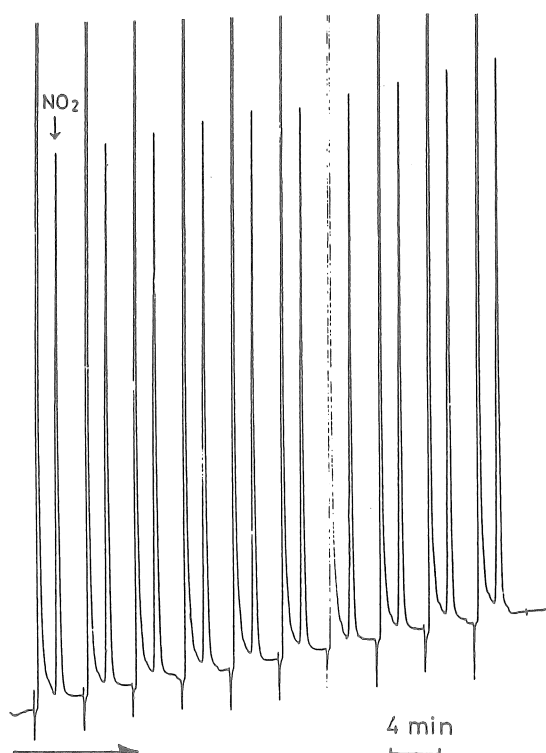


図 9。繰り返し注入による微量分析の
為のクロマトグラム。

カラム : Asahipak ODP-50
(0.53 mm X 75 mm)
試料 : 海水に0.5 ppm 亜硝酸を添加
試料量 : 0.5 μl
溶離液 : 5 mN H_2SO_4
流速 : 30 $\mu\text{l}/\text{min}$
温度 : 室温
検出 : 電気化学検出器
(+0.8 V vs. Ag/AgCl)

4. 今後の課題

従来のクロマトグラフィーでは困難であった高濃度の塩をマトリックスとする溶液中に含まれるppbあるいはサブppbレベルの無機陰イオン特に亜硝酸の分析法を開発した。海水を試料として添加した亜硝酸は予定どおりマトリックスイオンから分離定量出来ることを示したが本研究で目的とする養殖池で系統的に採取した実試料の迅速分析に応用するまでには至っていない。この点に関しては現在計画中であるが特に汚濁の激しい試料はカラムに損傷を与えるため、簡単で汚染のない前処理法について検討を進めている。

逆相分配カラムに対する炭酸と亜硝酸の保持機構についても検討を行っている。炭酸は酸性溶離液中では二酸化炭素として存在し、表面に吸着していると考えられるが、亜硝酸はより極性が高くその保持に関してはまだ明かでない。

Ion Chromatography of Inorganic Anions in Brine Samples

Souji Rokushika¹, Fumiko Yamamoto¹, Kazuko Kihara²
and Precilla F. Subosa³

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University¹.
Notre Dame Women's College² and
Southeast Asian Fisheries Development Center (Philippines)³.

Summary

The determination of low level anions in a brine water with ion-chromatography using two different column systems have been studied.

A conventional low ion-exchange capacity anion exchange column was employed in a chloride form and eluted with sodium or potassium chloride eluents. A large chloride matrix ion peak in a brine sample eluted at the void volume of the column.

Bromate, bromide, nitrate and nitrite ions in a brine sample were thoroughly separated from each other, and any distortion in the peak shape of four anions was observed up to ca. 20 mg/ml of the chloride concentration in the sample solutions.

When 50 ul of brine sample was injected on the column and monitored with a UV detector, the detection limit of nitrite spiked in the seawater was 2.4 ng/ml as $\text{NO}_2\text{-N}$.

Next, a poly(vinylalcohol) gel based reversed phase column, Asahipak ODP-50 column was examined. Carbonate and nitrite were retained and separated each other with 1-10 mN sulfuric acid eluents. Cations and other inorganic anions were evicted from the column. A follow fiber cation exchange membrane tube with a 50 mN sodium sulfate enhancer system worked efficiently to detect carbonate at a conductivity detector. Nitrite peak area was also increased with the enhancer when a UV detector is used.

A micro column connected to an electrochemical detector proved the applicability of the method for the repeated injection of the seawater sample spiked with nitrite at ppb level. The detection limit of nitrite in the system was 2.5 pg as $\text{NO}_2\text{-N}$.