報 文^{*1}

C₃₀ 固定相/イオン対クロマトグラフィーによる亜硝酸 及び硝酸イオンの分析

平 木 登^{®*2}, 磯崎 昭徳^{*3}, 長 嶋 潜^{*4}

Determination of nitrite and nitrate ions by ion-pair chromatography with C₃₀ as a stationary phase

Noboru HIRAKI^{*2}, Akinori ISOZAKI^{*3} and Hisomu NAGASHIMA^{*4}

^{*2} Tokyo Kaseigakuin high school, 22, Sanbanchou, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8341

^{*3} Department of Materials and Applied Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, 1-8-14, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308

^{*4} NAC Techno Service Co., Ltd., 5-21-39, Kamisaginomiya, Nakano-ku, Tokyo 165-0031

(Received 1 May 2002, Accepted 20 August 2002)

A method for the determination of nitrite and nitrate ions has been developed for ion-pair chromatography (RP-HPLC) with a new C₃₀ column, coupled with an UV detector at 210. A phosphate buffer (pH 6.0) containing 2 mM tetrabutylammonium (TBA-OH) in 10(v/v)% acetonitrile was used as an optimal mobile phase for the separation of six anions (NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻, SeO₃²⁻, SeO₄²⁻ and I⁻). The six anions were efficiently separated within 25. Especially, the calibration curves of the nitrite and nitrate ions, to 50.0 µg/ml from 0.05 µg/ml, were linear with excellent correlation coefficients of more than 0.999 and a relative standard deviation of under 1 % from 10 repeated measurements; and limits of detection were 5 ng/ml (S/N = 3).

Keywords : ion-pair chromatography; inorganic anions; UV detector; tetrabutylammonium; new C₃₀-silica column.

1 緒 言

逆相イオン対クロマトグラフィー (RP-HPLC) による無機陰イオン分析には、通常オクタデシルシリル化シリカ (ODS) (C₁₈) カラムが用いられているが、C₈やC₂₂など多種類の分離カラムも開発されている。一般的に ODS カラムは、水の濃度が 100% に近い移動相を使用すると、時間の経過とともに保持の減少・再現性の低下等の難点がある。一方、C₃₀ 固定相はトリアコンチル基を主成分とするアルキル基を有する新しい固定相であり、炭素鎖が長い

め ODS とは大きく性質が異なり、水 100% 移動相においても高い再現性を示すことが報告されている¹⁾。

本報文では、RP-HPLC により紫外 (UV) 吸収を有する 6 種無機陰イオン (NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻, SeO₃²⁻, SeO₄²⁻ 及び I⁻) の溶離挙動を調べるとともに、特に亜硝酸及び硝酸イオンの分離定量法を検討した。その結果、水 100% に近い移動相を用いる無機陰イオンの RP-HPLC においても、長期にわたり十分な保持の再現性と高い理論段数の得られることが確認された。また、著者らが行ったカーボン充填カラムを用いるイオンクロマトグラフィー (IC)^{2)~4)} と比較しても、UV 吸収を有するイオンについては優れた分離と理論段数を示している。本法を水道水、河川水等の水試料に適用したところ良好な結果を得たので報告する。

^{*1} 若手研究者の初論文特集

^{*2} 東京家政学院高等学校: 102-8341 東京都千代田区三番町 22

^{*3} 日本大学理工学部物質応用化学科: 101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14

^{*4} 株式会社ナックテクノサービス: 165-0031 東京都中野区上鷺宮 5-21-39

Table 1 Operating conditions of ion-pair chromatography

Column	Develosil C30-UG-5 (4.6 mm i.d. × 250 mm)
Eluent	2 mM TBA-OH-20 mM phosphate buffer (pH 6.0)-10 (v/v)% CH ₃ CN
Flow rate	0.8 ml/min
Injection volume	50 µl
Detection	UV (210 nm)
Column temperature	room temp.

TBA-OH: tetrabutylammonium hydroxide

2 実験方法

2.1 ICの構成

装置は、ポンプに島津製作所製 LC-9A, 検出器に日立製作所製 655 型紫外吸光検出器を, 分離カラムは野村化学製の Develosil C₃₀-UG-5 (4.6 mm i.d. × 250 mm) (以下 C₃₀カラム) を用いた。データ処理装置は島津製作所製クロマトパック C-R6A を組み合わせて構成した。また, 試料溶液は Rheodyne 製 7125 型ループインジェクターを用いて注入した。

2.2 試薬

リン酸緩衝溶液 (リン酸二水素カリウム, リン酸水素ナトリウム) はいずれも和光純薬製特級試薬を用いて 100 mM (pH 6.0) 溶液を調製し, 適宜水で希釈して用いた。標準試料溶液 (I⁻, Br⁻, NO₂⁻ 及び NO₃⁻) は, いずれも特級試薬のナトリウム塩を, SeO₃²⁻ 及び SeO₄²⁻ は一級試薬のナトリウム塩を用いて調製した。また, アセトニトリルは和光純薬製 HPLC 用を用いた。水酸化テトラブチルアンモニウム (TBA-OH) は Dionex 製 0.1 M 溶液をその都度希釈して使用した。水はすべて日本ミリポア製 MilliQ-gradient A-10 により精製したものを使用した。

2.3 測定条件

IC 測定条件を Table 1 に示す。移動相には, 2 mM TBA-OH, 20 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0), 10 (v/v)% アセトニトリル混合溶液を用いて 0.8 ml/min の流量で流し, ベースラインを安定化させた後試料溶液を注入する。ベースラインの定常化には約 40 分を要する。また, 測定波長について種々検討し 210 nm を使用した。本法ではクロマトグラムの測定にピーク面積法を用いた。

3 結果及び考察

3.1 無機陰イオンのクロマトグラム

最適条件における 6 種無機陰イオン (NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻, SeO₃²⁻, SeO₄²⁻ 及び I⁻) のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。それぞれのイオンは 25 分以内に良好に分離さ

Fig. 1 Chromatogram of standard solution

Ions (µg/ml): ① HSeO₃⁻ (20); ② NO₂⁻ (5); ③ Br⁻ (20); ④ NO₃⁻ (5); ⑤ SeO₄²⁻ (50); ⑥ I⁻ (20); Column: Develosil C₃₀-UG-5; Eluent: 2 mM TBA-OH, 20 mM phosphate-buffer solution (pH 6.0), 10% (v/v) CH₃CN; Column temperature: room temp.

れた。なお, 210 nm 付近では, Cl⁻, HPO₄²⁻ 及び SO₄²⁻ イオン並びに TBA-OH 及びアセトニトリルはバックグラウンド吸収に影響を与えない。

3.2 分離条件の検討

3.2.1 移動相中のアセトニトリル濃度 移動相中のアセトニトリル濃度を 5~20% まで変化させたときの保持時間に及ぼす影響を Fig. 2 に示す。アセトニトリルは, C₃₀ 固定相表面の TBA-OH に保持された陰イオンを速やかに溶出させるものである。よって, この濃度の増加に伴い各イオンの保持時間は減少した。アセトニトリル濃度を 20% 以上にすると分離が不十分となった。また, アセトニトリル濃度を小さくすると各イオンの溶出が遅くなる。各イオンの分離度を考慮して, アセトニトリルの最適濃度を 10% に定めた。

3.2.2 移動相中のリン酸緩衝溶液の濃度 移動相中のリン酸緩衝溶液濃度を 10~50 mM (pH 6.0) の範囲で変化させたときの保持時間に及ぼす影響を Fig. 3 に示す。リン酸緩衝溶液は, 溶離剤として各成分の保持を制御し, 特に一価, 二価イオンの分離には影響を与える。緩衝液濃度の増加に伴い全体的に保持時間は減少した。また, リン酸緩衝溶液濃度が 30 mM 以上になると分離不十分となり, 40 mM 以上ではセレン酸イオンと硝酸イオンの保持時間が逆転した。分離能及び保持時間を考慮してリン酸緩衝溶液濃度を 20 mM とした。C₃₀ カラムの分離機構の考察のため, 保持係数 (*k*) とリン酸緩衝溶液の濃度 (mM)

Fig. 2 Effect of CH₃CN concentration on retention time

Ions($\mu\text{g/ml}$): ■ HSeO₃⁻ (20); ▲ Br⁻ (20); ● NO₂⁻ (5); □ NO₃⁻ (5); △ SeO₄²⁻ (50); ○ I⁻ (20); Eluent: 2 mM TBA-OH, 20 mM phosphate-buffer (pH 6.0), CH₃CN

Fig. 3 Effect of phosphate-buffer concentration on retention time

Ions($\mu\text{g/ml}$): ■ HSeO₃⁻ (20); ▲ Br⁻ (20); ● NO₂⁻ (5); □ NO₃⁻ (5); △ SeO₄²⁻ (50); ○ I⁻ (20); Eluent: 2 mM TBA-OH, phosphate-buffer (pH 6.0), 10% (v/v) CH₃CN; { Buffer solution (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) pH 6.0 }

の対数をプロットした結果を Fig. 4 に示す。二価イオンのセレン酸イオンのみがほかのイオンに比べて2倍以上の傾きを示した。亜セレン酸イオンは、中性付近では一価

Fig. 4 Relationships between capacity factor (k) and concentrations of eluent, phosphate buffer

Ions($\mu\text{g/ml}$): ■ HSeO₃⁻ (20); ▲ Br⁻ (20); ● NO₂⁻ (5); □ NO₃⁻ (5); △ SeO₄²⁻ (50); ○ I⁻ (20); Eluent: 2 mM TBA-OH, phosphate-buffer (pH 6.0), 10% (v/v) CH₃CN; { Buffer solution (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) pH 6.0 }; Log $k = -y/x \text{ Log } [E] + \text{const}$: k , capacity factor; y , effective charges of analyte; x , charges on eluent; E , concentration of eluent

のイオン (HSeO₃⁻) として存在するため、ほかのイオンと同じ傾きになったと考えられる。以上のように、本法における分離機構は、イオン交換カラムにおける理論式と一致したことより、通常の IC に用いられているイオン交換樹脂カラムと同様に、イオン交換分離が支配的と考える。

3・2・3 移動相中の TBA-OH 濃度 移動相中の TBA-OH の濃度を 1~5 mM まで変化させたときの保持時間に及ぼす影響を Fig. 5 に示す。イオン対試薬である TBA-OH は固定相表面に吸着し、カラム内を流れる試料イオン (X⁻) と疎水性のイオン対を生成し固定相に保持される。したがって、TBA-OH 濃度の増加に伴い各イオンの保持時間は徐々に増加した。特に、疎水性のヨウ化物イオンでは大きく変化した。以上のことより、TBA-OH の最適濃度を 2 mM とした。

3・3 亜硝酸と硝酸イオンの分析精度

亜硝酸及び硝酸イオンについて、検量線の直線性並びに繰り返し注入による再現性を調べた。亜硝酸及び硝酸イオンを含む標準試料溶液 50 μl をループインジェクターにより直接注入し、ピーク面積法により得られた結果を Table 2 に示す。NO₂⁻ と NO₃⁻ の検量線について、0.05~0.50 $\mu\text{g/ml}$, 0.50~5.0 $\mu\text{g/ml}$ 及び 5.0~50.0 $\mu\text{g/ml}$ と 3 段階に分けて作成した。3 段階の検量線は、ほぼ等しい傾きを

Table 2 Precision of ion-pair chromatography based on peak area measurements

Anion	Linearity		Reproducibility		Limits of detection
	Range/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	r ($n=6$)	$\mu\text{g/ml}$	RSD, % ($n=10$)	ng/ml ($S/N=3$)
NO_2^-	0.05~0.50	0.9997			
	0.50~5.00	0.9996	4	0.68	5
	5.00~50.0	0.9991	40	0.51	
NO_3^-	0.05~0.50	0.9992			
	0.50~5.00	0.9999	4	0.59	5
	5.00~50.0	0.9995	40	0.35	

RSD: relative standard deviation

Fig. 5 Effect of TBA-OH concentration on retention time

Ions ($\mu\text{g/ml}$): ■ HSeO_3^- (20); ▲ Br^- (20); ● NO_2^- (5); □ NO_3^- (5); △ SeO_4^{2-} (50); ○ I^- (20); Eluent: TBA-OH, 20 mM phosphate-buffer (pH 6.0), 10% (v/v) CH_3CN

示した。それぞれ6点注入したときの検量線の相関係数 (r) は、いずれのイオンも各段階において 0.999 以上であり、良好な直線性を示した。また、 $4 \mu\text{g/ml}$ における相対標準偏差 (%) は、 NO_2^- について 0.68, NO_3^- については 0.59 ($n=10$), $40 \mu\text{g/ml}$ においては 0.51 及び 0.35 ($n=10$) であった。また、本法の検出限界 ($S/N=3$) は NO_2^- と NO_3^- いずれも約 5 ng/ml であった。

3・4 C_{30} カラムの耐久性

本法における理論段数 (N) は、 NO_2^- : 11000 段、 NO_3^- : 13000 段と通常のイオン交換カラムに比べて高い理論段数を示した。なお、カラムの耐久性では、本カラムを約1年間にわたり日常的に使用したが、保持の再現性、分離能及び理論段数の低下は認められない。したがって、

Table 3 Analytical results for nitrite and nitrate ions in water samples

	$\text{NO}_2^- / \mu\text{g ml}^{-1}$	$\text{NO}_3^- / \mu\text{g ml}^{-1}$
Kanda-surugadai ^{a)} (tap water)	N.D.	15.3
Tateshina ^{b)} (tap water)	N.D.	1.0
Kanda-surugadai ^{c)} (river water)	0.1	3.0

Each sample solution was filtered with a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter.

N.D. = Not detected. a) Aug. 10, 2001, at Chiyoda-ku, Tokyo. b) Aug. 4, 2001, at Kitasaku-gun, Nagano. c) Jan. 10, 2002, at Chiyoda-ku, Tokyo

従来の ODS カラムに比べると耐久性は優れているものと推察される。

3・5 実試料への適用

本法を水道水、河川水等に適用した結果を Table 3 に示す。試料はあらかじめメンブランフィルター (口径 $0.45 \mu\text{m}$) を使用した。亜硝酸及び硝酸イオンについて標準添加法で測定した結果とよく一致した。なお今回、水道水中からは亜硝酸イオンは検出されなかった。

本研究を行うに当たり、実験に協力いただいた日本大学理工学部物質応用化学科 4 年伊藤好宏君に感謝致します。

(2001 年 11 月, 日本分析化学
会第 50 年会において一部発表)

文 献

- 1) 榎並敏行, 長江徳和: *Chromatography*, **22**, 33 (2001).
- 2) 長嶋 潜, 岡本利光: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **44**, 105 (1995).
- 3) T. Okamoto, A. Isozaki, H. Nagashima: *J. Chromatogr. A*, **800**, 239 (1998).
- 4) H. Nagashima, T. Okamoto: *J. Chromatogr. A*, **855**, 261 (1999).

要 旨

C₃₀ カラムは, トリアコンチル基 (C₃₀) を主成分とするアルキル基をシリカに化学結合させた新規な固定相である. このカラムを使用して, 無機陰イオンの逆相イオン対クロマトグラフィーに適用した. 水酸化テトラブチルアンモニウム (TBA-OH) 及びアセトニトリルを含むリン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 移動相を用い, 紫外吸光検出器を組み合わせた IC により, 紫外吸収 (210 nm) を有する 6 種無機陰イオン (NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻, SeO₃²⁻, SeO₄²⁻ 及び I⁻) の溶離挙動を調べた. 移動相組成の検討により, 6 種無機陰イオンを 25 分以内に良好に分離定量することができた. 特に, 亜硝酸及び硝酸イオンの分離定量法について検討した. 定量範囲は 0.05 ~ 50 µg/ml であり, 検出限界は 5.0 ng/ml (S/N = 3) であった. また, 検量線は相関係数 0.999 以上を示し, また繰り返し測定による相対標準偏差は 1% 未満 ($n = 10$) と良い再現性を示した. 確立した定量法を水道水, 河川水に適用し良好な結果が得られた.