ポストカラムHPLCによる環境水中の 微量ほう素と他の無機陰イオンの同時分析法

松居 正巳¹⁾, 藤田登美雄²⁾, 西川 雅高³⁾, 中杉 修身³⁾, 平田 健正⁴⁾

¹⁾株式会社島津製作所応用技術部 (〒305-0031 茨城県つくば市吾妻3-17-1)

²⁾株式会社島津製作所LC部 (〒259-1304 神奈川県秦野市堀山下380-1)

³⁾国立環境研究所 (〒305-0053 茨城県つくば市小野川16-2)

⁴⁾和歌山大学システム工学部 (〒640-8510 和歌山県和歌山市栄谷930)

[平成11年4月23日受理]

Simultaneous Determination of Boron at ppb Level and Other Anions in Various Natural Water Samples by HPLC with Post-column Derivatization

Masami MATSUI¹⁾, Tomio FUJITA²⁾, Masataka NISHIKAWA³⁾, Osami NAKASUGI³⁾
and Tatemasa HIRATA⁴⁾

¹⁾Shimadzu Corporation, Tsukuba Environmental Analytical Laboratory
(3-17-1 Azuma, Tsukuba, Ibaraki 305-0031)

²⁾Shimadzu Corporation, HPLC Business Department
(380-1 Horiyamashita, Hadano, Kanagawa 259-1304)

³⁾National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-0053)

⁴⁾Dept. of Environmental Systems of Systems Engineering, Wakayama University
(930 Sakaedani, Wakayama 640-8510)

[Received April 23, 1999]

Summary

It examined about the method of the HPLC post-column derivatization which used the reaction reagent of the chromotropic acid to analyze small amount boron in various water samples, and it developed the HPLC system of analyzing simultaneously with the inorganic anions such as fluorine, chlorine, nitric acid, nitrous acid, sulfuric acid and boron.

This method was separated an component of anions by column of HPLC and after analyzing a fluorine, chlorine, nitric acid, nitrous acid and sulfuric acid with the conductivity detector, it analyzed boron with the fluorescence detector at ex. 330nm and em. 355nm by the method of the post-column derivatization.

It compared about the measurement value of this method, the ICP emission spectrochemical analysis and other method for boron in environment samples. As a result, the measurement value of this method and ICP agreed.

It seems to be effective as the simultaneous analysis method of inorganic anions such as fluorine, chlorine, nitric acid, nitrous acid, sulfuric acid and boron in the tap and river water.

Key words: boron, water samples, simultaneous determination for inorganic ions, HPLC post-column method, fluorescence detector

1. はじめに

ほう素化合物は金属の脱酸化剤、シリコン半導体、医薬品、窯業、塗料、自動車部品などの工業原料として用いられているだけでなく、家庭では防虫や消毒剤として知られている化学物質である。水質汚濁防止法では排水基準の要監視項目として0.2mg/ℓの基準が掲げられていたが、最近になって、水質汚濁に係わる環境基準項目にほう素が追加された。

その分析法には HPLC 法^{1,2)}、吸光光度法^{3,4)}、フローインジェクション法 (FIA)⁵⁾、ICP 発光分析法⁶⁾、ICP-MS⁷⁾ などがある。水質試験において工場排水試験方法 (JIS K 0102) では吸光光度法や ICP 発光分析法による方法が採用されているが、排水基準項目や要監視項目を含め49成分が対象になり、数多くの成分を分析するために効率的な分析法が求められている。また、河川や湖沼水の動態調査では試料点数が多く、数百 ml の試料を分析施設まで輸送しなければならず、調査地点で測定できないいわゆる、オンサイト分析法が望まれる。吸光光度法にはコンパクトな測定器もあり調査地点での測定が可能であるが、従来法は分析感度が悪く先の基準値の感度を満足できない。ICP 発光分析法や ICP-MS は、ほう素を高感度で測定できるが、装置が高価なこととオンサイト分析に向かない欠点がある。

本研究では環境水中に存在するほう素について、他成分も含めた一斉分析を目的として、ほう素-クロモトロープ酸誘導体化によるポストカラム-HPLC 法を適用することを試みた。ほう素-クロモトロープ酸誘導体化の温度、試薬濃度、時間などの反応条件について検討し、蛍光光度検出法でその誘導体化反応および分離条件を検討し、水道水や河川水中のふっ化物、塩化物、硝酸、亜硝酸及び硫酸などの陰イオンとほう素を同時に分析できる方法を開発したので報告する。

2. 実験

(1) 試薬

EDTA 及び1,8-Dihydroxy-3,6-naphthalenedisulfonic acid (クロモトロープ酸) は株式会社同仁化学研究所、8-Hydroxy-1-(salicylideneamino)-3,6-naphthalenedisulfonic acid, disodium salt (アゾメチン H) は和光純薬工業株式会社、Octyltrimethylammonium chloride (OTMA-Cl) は東京化成工業株式会社製のものをを用いた。

クロモトロープ酸誘導体の反応試薬は EDTA 1g, クロモトロープ酸 (ナトリウム塩) 200mg, OTMA-Cl 1g を精製水1000ml に溶解し、酢酸バッファーで pH4.8に調整

したものを原液とし、これを精製水で希釈して用いた。

アゾメチン H によるほう素の分析に用いる試薬調整条件には、ポストカラム HPLC 法²⁾、FIA 法⁵⁾及び吸光光度法³⁾などがある。ここでは検出感度を考慮し、ポストカラム誘導体化の反応試薬は、最適条件が示されている野瀬らの方法⁵⁾で調製した。すなわち、400ml のイオン交換水に52.8g のリン酸水素二アンモニウム、5g のアスコルビン酸と EDTA、1.25g のアゾメチン H を溶解し、これにリン酸を用いて pH7.2に調製した (500ml) 溶液をポストカラムの反応試薬にした。

(2) 装置

実験には島津製作所製高速液体クロマトグラフ LC-10A システムと紫外可視分光光度計検出器 SPD-10AV、分光蛍光検出器 RF-10A、電気伝導度検出器 CDD-6A などの検出器を組み合わせて分析システムとした装置を用いた。カラム温度を40℃とし、カラムに IC-A1 (島津製、4.6mm I.D., 100mm L.)、2.5mM Phthalic acid と2.4mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane の水溶液を移動相 (溶離液) とし、送液速度は1ml/min に設定して行った。

反応液は HPLC の送液ポンプで流速を調整できるようにして反応コイルに流した。未反応の蛍光試薬の除去は反応コイルの出口に0.5mol の NaOH 水溶液をペリスタリックポンプで送液して、分光蛍光検出器に導入した。

(3) 試料

実験に用いた標準試料はオルトほう酸0.572g をポリエチレン製100ml 容メスフラスコに入れ、精製水を標線まで加えこれを標準試料原液とした。この原液を希釈してほう素濃度が0.01mg~5.0mg/ℓの標準試料を用いた。また、河川及び水道水等の実試料については採取後、直ちに0.2μm のメンブランフィルター濾過したものをを用いた。

(4) ほう素と他の無機陰イオンの同時分析

送液ポンプで1ml/min の速度で溶離液の移動相2.5mM Phthalic acid と2.4mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane は試料導入装置、40℃に設定したカラム IC-A1 (4.6mm I.D., 100mm L.)、電気伝導度検出器、ポストカラム誘導体化試薬送液ポンプ、反応コイル (長さ0.5~3.5m, 内径0.4mm)、紫外可視分光光度計検出器 (波長425nm に設定) あるいは分光蛍光検出器 (励起波長: 330nm, 蛍光波長: 355nm) から構成されるポストカラム HPLC に送液される。

その操作と原理は、ほう素及び無機陰イオンを含む試

料20~200 μl をマイクロシリンジで試料導入装置に導入し、陰イオン分析用カラムでほう素及び無機陰イオン成分を分離する。分離した各成分は、溶離液と共に電気伝導度検出器に送液され、ふっ化物、塩化物、硝酸、亜硝酸及び硫酸などの無機陰イオン成分が検出される。ほう素は、電気伝導度検出器出口でアゾメチン H あるいはクロモトロブ酸の反応試薬と混合され、反応コイル内でほう素誘導体化合物を生成する。アゾメチン H 試薬との反応生成物は紫外可視分光光度計検出器、クロモトロブ酸試薬との反応生成物は分光蛍光検出器で検出した。

試料中のほう素と無機陰イオン成分の濃度は電気伝導度検出器、紫外可視分光光度計検出器あるいは分光蛍光検出器の出力をクロマトグラフィー用データー処理機クロマトバック C-R7A で同時に処理して求めた。

3. 結果及び考察

(1) 分析装置のシステム

HPLC によるほう素の分析は、アゾメチン H を反応試薬としたポストカラム誘導体化¹⁾とクロモトロブ酸を用いたプレカラム誘導体化²⁾が報告されている。水環境試料中のほう素はその指針値が0.2mg/l であり、その1/10を測定できることと指導されている。アゾメチン H 誘導体化法はクロモトロブ酸誘導体化法より1ケタ感度が劣る。クロモトロブ酸を用いたプレカラム誘導体化法は、ほう素の検出限界が0.001mg/l と、検出感度が高い。しかし、プレカラム誘導体化法では環境中のほう

素、ふっ化物、塩化物、硝酸、亜硝酸及び硫酸などとの一斉分析に適応できないため、ポストカラム誘導体化法について検討した。

クロモトロブ酸は環境中のメタノールの定量法⁸⁾として報告されたが、ほう素分析に適用した化学反応については Fig. 1 に示した。クロモトロブ酸 (I) は酸性条件下でほう素が存在すると、ほう素-クロモトロブ酸 (II) を生成する。この化合物は蛍光波長355nm で極大発光スペクトルを示す。この波長領域では、過剰の反応試薬であるクロモトロブ酸 (I) が妨害し、バックグラウンドが高くなる。これを水酸化ナトリウムでアルカリ性になるとクロモトロブ酸ナトリウム塩 (III) となり、この波長領域での吸収がなくなることが判った。これらの化学反応を利用して、ほう素を選択的に高感度で検出することが出来ると考え、分析システムを組み立てた。Fig. 2 にその概要を示すが、この装置の流路は、HPLC ポンプ①、インジェクター②、40℃のカラム恒温槽③内のカラム④を経て、電気伝導度検出器⑤につながっている。検出器⑤出口の流出液はペリスタリッックポンプ⑨によって送液された蛍光試薬⑪と混合する。次に反応恒温槽⑥内の反応コイル⑦を経た後、NaOH 水溶液⑫と混合し、蛍光検出器⑧で測定される。測定後の溶液はドレイン容器⑬に排出される。

(2) 本システムによる最適分析条件の検討

(2-1) 反応温度の影響

ほう素ピーク面積が反応温度に関係すると考え、反応

Fig. 1 Reaction mechanism of boron derivatization with chromotropic acid

Fig. 2 Schematic diagram of HPLC with post-column derivatization method for boron analysis

1: pump for eluting solvent, 2: sample injector, 3: column oven (40°C), 4: separation column (Shim-pack IC-A1 4.6mmx 10cm), 5: conductivity detector, 6: chemical reaction box, 7: reaction coil, 8: fluorescence detector for HPLC, 9: pump for reaction reagent, 10: eluting solvent, 11: chemical reagents (chromotropic acid), 12: sodium hydroxide solution, 13: effluent

コイルを2.0m一定とし、反応恒温槽の温度だけを20～80℃に変化させた。

CI-A1分離カラムを40℃、移動相の流速は1.0mℓ/minに固定し、また反応試薬はクロモトロープ酸 (1.0mM)、酢酸バッファーでpH 4.8に調整したOTMA-Cl (100mM)を用いた。これらの条件で反応恒温槽の温度を20～80℃まで変化させ、ほう素標準液 (5.0mg/ℓ) を分析した。得られたクロマトグラム上のほう素のピーク面積と反応温度の関係を Fig. 3に示した。

反応槽温度が高くなるにつれて、ほう素のピーク面積は大きくなる傾向があったが、40℃と80℃のピーク面積を比較しても約1.5倍しか増加しなかった。環境水中のほう素の分析では反応温度が40℃でも十分な感度が得られること、また、カラム恒温槽と反応恒温槽を一つにした方が実用的と判断し、以後の本実験ではカラム恒温槽内に反応コイルを入れ、40℃恒温とした。

(2-2) クロモトロープ酸誘導体化反応試薬濃度の影響

反応試薬原液を精製水で1000倍まで希釈し、反応試薬の濃度とほう素-クロモトロープ酸誘導体生成について調べた。カラムを40℃、移動相の流速は1.0mℓ/minの条件下で、ほう素標準溶液 (0.5mg/ℓ) を分析した。得

られたクロマトグラム上のほう素のピーク面積と反応試薬濃度の関係を Table 1に示した。

この結果から EDTA 10mg、クロモトロープ酸 (ナトリウム塩) 2mg、OTMA-Cl 10mg を精製水1000mℓに溶解し、酢酸バッファーで pH4.8に調整した試薬が、ポストカラム誘導体化反応試薬として適していることが判った。

(2-3) 反応試薬の送液速度の影響

ほう素のピーク面積が反応試薬の送液速度によって影響を受けることが判った。反応試薬 (前述2-2) を反応コイル長 (2.0m) および反応温度 (前述2-1) と固定した条件下で、反応試薬の最適送液速度について検討した。

その結果を Table 2に示す。反応液の送液速度を速くするとほう素のピーク面積が大きくなり、速くすると小さくなる傾向があった。つまり、HPLCの移動相 (1.0mℓ/min, 一定) に対し、反応試薬の送液速度が早くなるため、反応試薬濃度だけが高くなり、相対的にほう素のピーク面積が小さくなるということである。

(2-4) 反応コイルの長さによる影響

一般に、HPLCのポストカラム誘導体の反応時間は反応コイルの長さによって左右される。

Fig. 3 Relationship between reaction temperature and peak area of boron

Table 1 Sufficient concentration of reaction reagents for post-column derivatization of boron

Concentration of chromotropic acid(mg/l)	Peak area of boron(μV·sec)
200.00	1625
100.00	1627
10.00	1621
2.00	1618
0.40	1108
0.20	726

Sample: Boron 0.5ppm

Sample size: 20μl

Flow rate of eluting solvent:1.0ml/min.

Flow rate of reaction reagent:0.5ml/min.

Table 2 Relationship of reaction reagents flow rate and peak area on HPLC with post-column derivatization method for boron

Flow rate of reaction reagent (ml/min)	peak area of boron (μV·sec.)
0.01	15615
0.10	16535
0.50	16505
1.00	16589
1.50	15859
2.00	15638
2.50	14978

ほう素濃度5.0mg/lの水溶液を分析試料として、反応温度40℃、移動液速度1.0ml/min、反応液速度0.5ml/minの条件下で反応コイルの長さとはう素のピーク面積について調べた。

外径1.6mm、内径0.4mmのテフロン製反応コイルを用い、その長さを0.5～3.0mまで変化させた。

その結果をFig. 4に示したように、反応コイルが長くなれば、ほう素のピーク面積が増大する傾向にあった。しかし、3.0m以上の反応コイルでは、クロマトグラムのほう素ピークがブロードとなるが、これ以下では感度的に悪くなるが、環境基準値の1/10以下を十分に定量できる。実用的なことを考慮すれば1.5～2.5mの反応

コイルが適していた。

(2-5) HPLC クロマトロープ誘導体化法のほう素の定量限界値

JIS K0102工場排水試験法のほう素分析法は、メチレンブルー吸光光度法、アゾメチンH吸光光度法、ICP発光分析法がある。これらのほう素の定量範囲はメチレンブルー吸光光度法が10～100μg/l、アゾメチンH吸光光度法が200～1000μg/l、ICP発光分析法が10～10⁵μg/lである。アゾメチンHを反応試薬としたHPLCのポストカラム誘導体化法によるほう素の定量限界値は20μg/lと報告²⁾されている。

本実験でのHPLCによるクロマトロープ酸誘導体化法

Fig. 4 Effect of boron peak area on length of reaction coil

では定量限界値が $4\mu\text{g}/\ell$ でCV値が10.8%であった。アゾメチンHを反応試薬としたHPLCのポストカラム誘導体化法に比べて感度的にクロモトロープ酸誘導体化法が5倍程度高い結果となり、環境基準値の1/10以下を十分定量できることが判った。

(3) 実試料中への応用

HPLCのクロモトロープ酸ポストカラム誘導体化法を用いた環境水及び水道水中のほう素、硝酸及び硫酸などの一斉分析を試みた。Fig. 5に標準溶液(I)、河川水(II)及び水道水(III)のクロマトグラム例を示した。例示した河川水中の各成分の濃度は、ほう素 $0.072\text{mg}/\ell$ 、塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン $20\text{mg}/\ell$ 以上であった。また、水道水では、ほう素 $0.062\text{mg}/\ell$ 、塩化物イオンが $20\text{mg}/\ell$ 以上、硝酸イオン $0.5\text{mg}/\ell$ 、硫酸イオン $15\text{mg}/\ell$ であった。クロマト例からわかるように、1試料の一斉分析は、15分で全て終了する。

河川、湖沼及び水道水中に含まれるほう素について、ICP発光分析法、アゾメチンH及びクロモトロープ酸を反応試薬とするHPLCポストカラム誘導体化法の三方法の比較をした。その結果をTable 3に示す。本法とICP法による河川、湖沼及び水道水試料中のほう素分析値は、よく一致している。しかし、アゾメチンHを反応試薬とするHPLCポストカラム誘導体化法では、ほう素濃度が $0.02\text{mg}/\ell$ 以下では検出が困難であった。また、アゾメチンHを反応試薬とするHPLCポストカラム誘導体

化法では亜硝酸イオンの検出が報告²⁾されているが、今回の実験ではHPLCのカラムで亜硝酸イオン成分とほう素を分離しているの、ほう素分析に対する影響はなかった。本法で示したクロモトロープ酸を反応試薬とするHPLCポストカラム誘導体化法では、ほう素分析に影響する硝酸イオンを含め、他成分を分離検出できるため、環境水中のほう素を含めた他の陰イオン成分の同時分析に優れた選択性を有することが判った。

要 約

環境水中の微量ほう素を分析するためにクロモトロープ酸の反応試薬を用いたポストカラム誘導体化法について検討し、フッ素、塩素、硝酸、亜硝酸、硫酸及びほう素などの陰イオン成分と同時に分析する方法を開発した。この方法はHPLCのカラムで陰イオン成分とほう素を分離し、フッ素、塩素、硝酸、亜硝酸及び硫酸などの陰イオン成分を電気伝導度検出器で分析した後に、ほう素はクロモトロープ酸ポストカラム誘導体化法により励起波長 330nm 、蛍光波長 355nm の蛍光検出器で分析した。

環境試料で本法、ICP発光分析法及び他法などとはほう素の測定値について比較した。その結果、本法とICPの測定値は一致した。水道水や河川水中などのフッ素、塩素、硝酸、亜硝酸及び硫酸などの陰イオンとほう素の一斉分析法として有効と思われる。

Fig. 5 Chromatograms of boron and other anions in the river and tap water with two different detectors (fluorescence type or boron and conductivity type for other anions)
(I) Mixture standard samples, (II) River water sample, (III) Tap water sample

Table 3 Comparison of analytical data for boron contents in various water samples by HPLC with post-column derivatization method, azometine H method and ICP emission analysis

Sample	Determination of boron(mg/l)		
	Azometine H	HPLC(Chromotropic acid)	ICP
A	0.0538	0.0553	0.0600
B	ND	0.0446	0.0451
C	ND	0.0265	0.0335
D	ND	0.0186	0.0228
E	ND	0.0217	0.0184
F	ND	0.0156	0.0123
G	ND	0.0152	0.0098

Tap water: sample B and F

River water: sample A, C and D

Lake water: sample E and G

文 献

- 井上嘉則, 伊達由紀子: ポストカラム誘導体化イオン排除クロマトグラフィーによるホウ素の定量, 分析化学, **43**, 365-370 (1994)
- Ohshima, M., Motomizu, S. and Jin, Z.: Fluorometric Determination of Boric Acid by High Performance Liquid Chromatography after Derivatization with Chromotropic acid. *Analytical Sciences*, **6** 627-628 (1990)
- JIS ハンドブック環境測定: k 0102 工場排水試験方法 **47.1-47.2**, pp1176-1177, 日本工業規格協会編 (1993)
- 衛生試験法注解: 飲食物試験法, pp590-592, 日本薬学会編 (1990)
- 野瀬和子, 善木道雄, 石下靖昭: アゾメチン H を用いる吸光度検出フローインジェクション法によるホウ素の定量, 分析化学, **42**, 351-355 (1993)
- JIS ハンドブック環境測定: k 0102 工場排水試験方法, **47.3**, pp1177, 日本工業規格協会編 (1993)
- 環境庁水質保全局: 環境庁告示第14号, 付表 7 (1999)
- 五十嵐繁: クロモトロープ酸を用いるメタノール定量法の改良, 分析化学, **22**, 444-446 (1973)