

イオンクロマトグラフィーによる
無機イオンの同時定量に関する研究

群馬大学大学院理工学府 環境創生理工学領域

吉井 咲夢

目次

第1章 序論

1.1. 水環境問題と水質モニタリング技術.....	1
1.2. 水質評価技術におけるイオンクロマトグラフィー.....	2
1.3. イオンクロマトグラフィーとは.....	2
1.4. イオンクロマトグラフィーの基本的な装置構成.....	3
1.4.1. 溶離液.....	5
1.4.2. 送液ポンプ.....	5
1.4.3. インジェクター.....	5
1.4.4. カラムオープン.....	5
1.4.5. 分離カラム.....	5
1.4.6. サプレッサー.....	6
1.4.7. 検出器.....	9
1.5. イオンクロマトグラフィーにおける分離機構.....	9
1.5.1. イオン交換作用による分離.....	9
1.5.2. イオン排除作用による分離.....	13
1.5.3. イオン排除／陽イオン交換作用による分離.....	15
1.6. 水試料分析における IC の現状と課題.....	15
1.7. 陰イオンと陽イオンの同時分離.....	15
1.7.1. 複数のカラムを直列または並列に接続する同時分離.....	15

1.7.2.	一本の分離カラムを用いる同時分離	16
1.8.	本研究の目的	17
1.9.	参考文献	18
第2章 陰イオン分離 IC における分離カラムとしての陰イオン交換ガードカラムの 利用と無機陰および陽イオン同時分離法への応用		
2.1.	緒言	21
2.2.	実験	22
2.2.1.	装置	22
2.2.2.	カラム	22
2.2.3.	試薬	24
2.2.4.	河川水試料	24
2.3.	結果と考察	26
2.3.1.	陰イオン交換ガードカラムによる陰イオン分離	26
2.3.2.	実試料への応用	37
2.3.3.	陰イオン交換ガードカラムと陽イオン交換分離カラムの 組み合わせによる陰および陽イオンの同時分離定量	39
2.4.	結論	45
2.5.	参考文献	45

第3章 酸性溶離液を用いるジオール修飾シリカゲル固定相による

無機陰イオン分離

3.1. 緒言	47
3.2. 実験	48
3.2.1. 試薬	48
3.2.2. 実験条件	48
3.3. 結果と考察	49
3.3.1. 溶離濃度の影響	49
3.3.2. 溶離液陽イオンの影響	54
3.3.3. 予想される陰イオンの分離機構	56
3.3.4. カラム温度の影響	58
3.4. 結言	64
3.5. 参考文献	64

第4章 ジルコニア固定相による無機陰イオンの分離..... 66

4.1. 緒言	66
4.2. 実験	68
4.2.1. 試薬	68
4.2.2. ジルコニア	68
4.2.3. 陰イオン交換基修飾ジルコニアの作製	72

4.2.4.	物性評価.....	72
4.2.5.	イオンクロマトグラフィー.....	72
4.3.	結果と考察.....	73
4.3.1.	ジルコニアの物性に与える修飾回数の影響.....	73
4.3.2.	陰イオンの分離挙動に対する溶離液 pH の影響.....	78
4.3.3.	カラム性能評価.....	81
4.4.	結論.....	83
4.5.	参考文献.....	83
第5章 結言.....		85
5.1.	結論.....	85
5.2.	本研究の展望.....	86
5.3.	参考文献.....	86

第1章 序論

1.1. 水環境問題と水質モニタリング技術

地球環境問題の歴史は 18 世紀の産業革命以降に発生する各種の公害問題に遡る。人類は生産性を追求する経済的發展を遂げる一方で、自然資源の過剰消費は水・大気・土壌といった基盤環境の循環の中で修復可能な環境汚染の程度を超過し、世界各地で水質汚染・大気汚染・土壌汚染を起因とした公害問題が発生した [1, 2].

日本で発生した水質汚染による公害問題には、1956 年に発見された水俣病、1965 年に確認された新潟水俣病が有名である。これらの公害問題を背景に公害対策基本法が 1967 年に、水質汚濁防止法が 1971 年に、その上位法として環境基本法が 1993 年に施行された。環境基本法は農業や工業といった生産活動による排水だけでなく、地下への浸透水や生活雑排水も対象に、排水中の有害物質濃度や事業所からの総排水量を規制するものである。第 3 則では人体や水環境中に生息する生物に対して害を及ぼす汚染物質の環境基準を定めることを政府や地方自治体に求めている [2]。これらの法制度を経て日本の公共用水域における水環境は大幅に向上した。

日本国内の有害物質管理体制が整備される一方で、先進国と開発途上国とでは対策に国家格差が生じているのが現状である [1]。これに加え、年々加速している地球温暖化により、海域や湖沼等における富栄養化、酸性雨、海水の酸性化などといった、地球全体の水循環・物質循環と深く関連する、国境を越えた水環境問題が加速しており、喫緊の課題となっている。これに伴い、2015 年の国連サミットで採択された「持続可能な開発のための 2030 アジェンダ」に掲げられた 17 のゴールと 169 のターゲットから構成される「SDGs (Sustainable Development Goals)」では、そのうちの 7 つのゴールで「洪水の発生」「持続可能な水利用」「水質向上」「下水処理施設」など水に関する目標が記載されている [3]。特に、ゴール 6「安全な水とトイレを世界中に」、ゴール 12「つくる責任つかう責任」、ゴール 14「海の豊かさを守ろう」、ゴール 15「陸の豊かさも守ろう」では水循環または水系生態系に関するターゲットが含まれている。また、SDGs は開発途上国だけでなく先進国も含めた世界中の全ての国々が抱える課題を取り上げたものであり、国を超えた協力体制の構築によって社会課題の解決を図ることが求められている。以上から、企業や研究所等で新規事業に取り組む際には、開発途上国でも容易に導入可能な技術やシステムを開発することが求められる [4].

酸性雨、富栄養化、海洋の酸性化といった地球の水循環に関わる現代の水環境問題で

は、環境水中に含まれる物質の濃度の経時変化や経年変化を把握するための水質モニタリングが重要である。特に窒素（N）や硫黄（S）、リン（P）を含む化合物は、水系生態系だけでなく周辺の森林生態系や土壌生態系、大気環境など周囲の基盤環境や人間活動と密接に関わる物質であるため、その水中での動態や経時的・経年的な濃度変化、物質の存在バランス等を観察することで自然環境の状態や人間活動による汚染のレベルを評価することにもつながり [5]、ひいては気候変動の水環境への影響に対する緩和策（Mitigation）や適応策（Adaptation）の根拠となる情報を収集することにもなる。

以上から、水質モニタリングに用いる水質評価技術の向上は水環境問題の解決に貢献するが、同時に普及を図ることが必要である。特に 1.1 で述べたように、開発途上国でも容易に導入可能な水質評価技術を開発することは、水質評価に関する国家間の技術格差をなくすことにつながる。

1.2. 水質評価技術におけるイオンクロマトグラフィー

水質モニタリングに用いられる水質評価技術には、発光分光分析法、吸光度法、質量分析法など様々な手法がある [6]。その中でも特にイオンクロマトグラフィー（IC）は、水試料中に含まれる無機イオン、有機イオン、有機酸、有機塩基といったイオンの他成分同時分離分析に適しており [7]、水質モニタリング法として非常に優れた分析法である。環境水や農工業排水の試験に留まらず、大気中の微小粒子状物質（PM2.5）中に含まれるイオン種の分析食品中の成分分析に応用される。工業排水に対する JIS の公定試験法として定められており [8]、信頼性の高い分析法となっている。また、環境分野だけでなく医療分野にも応用され、汎用性の高い分析法である [9]。次項でイオンクロマトグラフィーについて説明する。

1.3. イオンクロマトグラフィーとは

クロマトグラフィー（chromatography）は、1903年にロシアの植物学者 Micheal Tswett によって初めて発表された物質の分離方法である。Tswett の業績は、ガラス管の出口に脱脂綿を詰めた筒（カラム）を作り、そこに炭酸カルシウム（固定相）を詰め、植物抽出液（試料）を乗せ、エーテル（移動相）を用いて流すと、目的の色素の分子量や移動相と固定相の分配速度の違いによって、数種類の色素を分離回収したことである。クロマトグラフィーの名付け親も Tswett であり、ギリシャ語の「色（chroma）」と「記録（graphos）」を語源としている。現在では発色の有無に関わらず、様々な物質を対象に

幅広く用いられている [10].

クロマトグラフィーでは、固定相中を通過する移動相に試料を注入することによって物質の分離を行うが、移動相の物質形態によって3種類に分かれる。移動相が気体の場合にはガスクロマトグラフィー (GC)、液体の場合には液体クロマトグラフィー (LC)、臨界点で液化した二酸化炭素を利用する場合には超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) と呼ばれる。いずれの場合でも物質の大きさ、電気的吸着、疎水性、親水性などの物理的特性を利用して目的成分を分離する。

本研究で扱うイオンクロマトグラフィー (IC) は、液体クロマトグラフィーの一種で、1975年に Small ら [11] によって発表された水質モニタリング法である。その後 IC は、米国環境省の支援と Dionex 社による独占的な製品化を背景に、様々な分野で公定法として採用されている [12]。IC の定義は、日本工業規格 JIS K 0127 のイオンクロマトグラフ通則 [13] によると、「溶離液を移動相として、イオン交換体などを固定相とした分離カラム内で試料溶液中のイオン種成分を展開溶離させ、電気伝導度検出器、電気化学検出器、分光光度検出器または蛍光検出器で同定する方法」と定義されている。しかし、実際には Fritz ら [14] によって定義された「イオン成分の同時分離計測を可能とする自動化された高速液体クロマトグラフィー (HPLC)」が広く一般的に受け入れられている。

1.4. イオンクロマトグラフィーの基本的な装置構成

ここでは IC での基本的な装置構成について説明する。IC は、Fig. 1 に示されるように、溶離液、送液ポンプ、インジェクター、カラムオープン、分離カラム、サブレッサーおよび検出器で構成される。

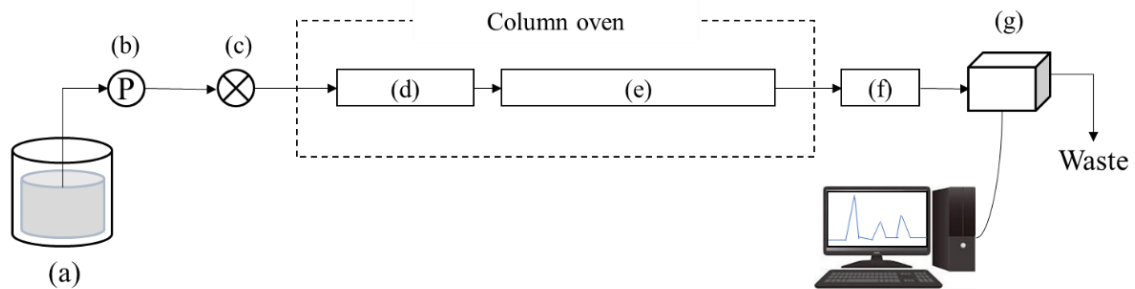


Fig. 1 Schematic illustration of ion chromatograph. (a) eluent, (b) pump, (c) injector, (d) guard column, (e) separation column, (f) suppressor, (g) detector

1.4.1. 溶離液

移動相となる溶離液は、分離したいイオンによって酸性溶離液と塩基性溶離液を使い分ける。溶離液は、pH を変化させる、または有機溶媒やモディファイヤーを添加することによって分析目的のイオンの溶出位置を調節することができる。溶離液には、1 種類の溶離液のみを用いるアイソクラティックモードと、2 種類の溶離液を切り替えて通液するグラジエントモードがある。溶出時間が極端に遅いイオンが試料に含まれる場合には、グラジエントモードを利用して分析時間を短縮することがあるが、検出器に導電率を用いる場合、バックグラウンドが変わってしまうため、次の分析に必要な平衡化に時間を要するというデメリットがある。

1.4.2. 送液ポンプ

溶離液を一定の流速を保持しながら流路に流すための部品である。流速は目的物質の溶出時間に大きく影響を与えるため、常に一定を保つ必要がある。一定流速を維持するプランジャーという部品を1つまたは2つ内包する。

1.4.3. インジェクター

インジェクターは移動相に試料を注入するためのもので、定量サンプルループ (10 μ L ~ 100 μ L) と呼ばれる試料注入用配管を付属するバルブが使用される。

1.4.4. カラムオーブン

カラムオーブンは分離カラムの温度を一定に保つための部品である。固定相・移動相間の溶質の移動速度を一定にするため、カラム内の温度変化があってはならない。特に IC で汎用される導電率検出は、温度が 1 $^{\circ}$ C 変化すると ± 2 % の応答変化が見られることから、温度設定は検出感度を左右する重要な役割を示す。また、温度変化によって溶離液・試料溶液の粘度などの物性変化、イオン価数の変化などの化学的変化等の可能性があり、目的成分の溶出時間等、分離挙動に大きく影響する。すなわち、カラム温度を変化させることによって溶出時間を調節することが可能とも言える。

1.4.5. 分離カラム

分離カラムは分離剤を充填した管であり、その分離剤が固定相ということになる。IC に用いる分離剤の種類は、シリカゲルやポリスチレン共重合体を基材にイオン交換基を

配位したイオン交換樹脂が主である。イオンの高分離能・高理論段数のイオン分離を得るには、分離剤の粒径が $2\ \mu\text{m}$ ~ $5\ \mu\text{m}$ の微小粒径が望ましいとされる。これは、移動相（溶離液）から固定相（イオン交換樹脂）の分配の回数が大きければ大きいほど、理論段数の増加が期待できるからである。

分離カラムは、標準試料や実試料中に含まれる不純物等によって劣化が次第に進むため、その劣化の進行を遅らせるために、ガードカラムを分離カラムの前に接続する。ガードカラムは分離カラムの保護を目的としたもので、充填剤は分離カラムと変わらないが、カラム長が $1\ \text{cm}$ ~ $3\ \text{cm}$ と短い。

また、カラムと溶離液の組み合わせによるが、測定前に 1~2 時間程度溶離液を連続的に通液することで、カラムの洗浄、および充填剤と溶離液の化学平衡の安定化を行う必要がある。

なお、本研究では、近年のイオン交換樹脂の微粒化や物理的強度・化学的耐性の向上に伴ってガードカラムの性能も向上していることに注目した研究を行っており、第 2 章にて詳述する。

1.4.6. サプレッサー

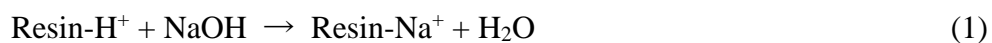
サプレッサーは、検出の前処理としてバックグラウンド導電率（以下、バックグラウンド）を低減させるための部品である。サプレッサーがイオンクロマトグラフの本体に内蔵されているものをサプレッサー型 IC、内蔵されていないものをノンサプレッサー型 IC と呼ぶ。本研究ではサプレッサー型 IC を使用している。

IC では導電率検出器が一般的に使用されるが、溶離液に含まれるイオンも電気伝導度を有しているため、分離したい成分よりも溶離液中のイオンの方が高い電気伝導度を有する場合、バックグラウンドが高くなり、試料イオンのピークが検出されないことがある。そのような場合に、分離カラムの後にサプレッサーを接続することによってバックグラウンドを予め低減させてから検出器を通すことができる。

陰イオンの分離では、カラム内の化学平衡状態を維持するために CO_3^{2-} や OH^- といったイオンが不可欠であるため、 Na_2CO_3 や NaOH といった塩基性の溶離液を用いる。 CO_3^{2-} や OH^- の対イオンである Na^+ は高い導電率を持つため、バックグラウンドが増大する。

本研究で使用したイオンクロマトグラフのサプレッサーは、水素イオン型陽イオン交換樹脂を用いたゲル型サプレッサーである [9]。式(1)及び(2)に Na_2CO_3 および NaOH を溶離液として使用した場合のサプレッサー内におけるイオン交換の化学反応式を、また

Fig. 2 にその模式図を表す.



以上のように、サプレッサー内で溶離液中の Na^+ を H^+ と入れ替えることで、溶離液を導電率の低い H_2CO_3 や H_2O に変化させ、バックグラウンドを低減することができる。

今日扱われている IC 装置のほとんどはサプレッサー型 IC となっているが、紫外可視吸光光度計や蛍光光度計のように、本質的にイオンの導電率を測定するものでなく、光の吸収や発光の強度を測定する場合には、サプレッサーは必要ない。また、IC の分離モードには、イオン排除型イオンクロマトグラフィー [15] のように、分離原理上サプレッサーを用いることができないものもある。

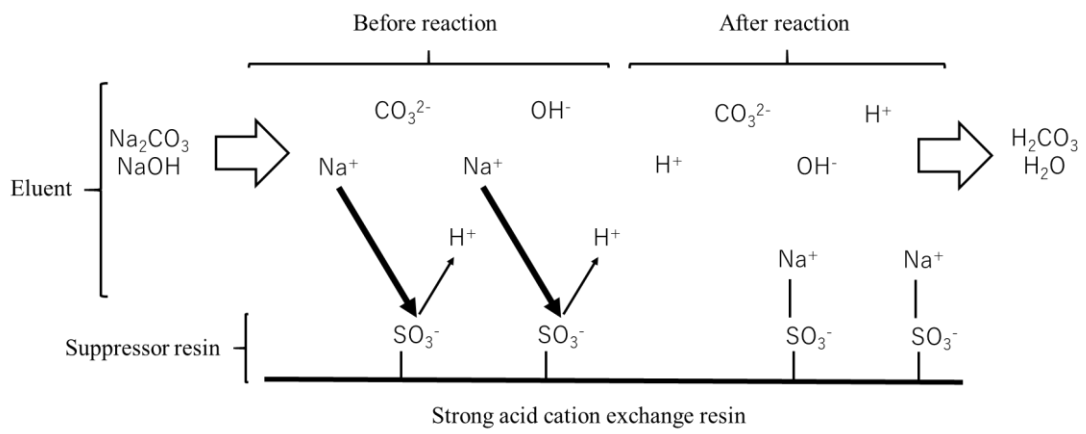


Fig. 2 Schematic illustration of ion exchange reaction in suppressor

1.4.7. 検出器

検出器は、目的成分の特性によって電気伝導度検出器、分光光度検出器、電気化学検出器が用いられているが、最近では質量分析計の使用が増えている。

電気伝導度検出器（導電率検出器）は、溶液中の導電率変化を測定することで目的成分の定量を行うもので、IC の検出器として最も一般的である。ただし、通過する溶液全てに対して導電率を検出しているのであり、目的成分に対して選択性があるわけではないため、炭酸溶離液など導電率の高い溶液を溶離液とする場合には、前項で説明したサブレッサーを用いた前処理が必要となる。本研究では導電率検出器を使用する。

分光光度検出器は、紫外線・可視光線を物質に照射した際の光吸収メカニズムを応用した検出器で、吸光度の変化を測定することで濃度定量を行う。目的成分に合わせた波長の光を照射する必要があるが、臭化物イオンや硝酸イオンなど 200 nm～220 nm の範囲で光吸収を有する物質を選択的に測定するには有効な検出器である。分光光度検出器を用いるには、紫外光・可視光領域に吸収を持つイオンを直接検出する方法と、カラムで分離した目的成分を発色試薬によって呈色させ、分光光度検出するポストカラム誘導体化法 [17-21] がある。特に、ヒ酸やリン酸 [18, 19] のようなオキソ酸や重金属 [20, 21] に対してはポストカラム誘導体化法を用いることが多い。

電気化学検出器は、主に糖類やアミノ酸の分析に用いられる。物質の酸化還元反応を発生させ電子を移動させることにより生じる電流を測定する [22]。

質量分析計（Mass Spectrometer : MS）を接続した IC-MS では、これまで IC では困難とされてきた微量成分の定性分析を可能としている。IC で分離された成分が、順次 MS に導入されることで、スペクトルを得ることができる。

1.5. イオンクロマトグラフィーにおけるイオンの分離機構

IC では、移動相（溶液）中のイオン物質と固定相（カラムに充填される分離剤）間の相互作用の種類によって、以下のように分類される。

1.5.1. イオン交換作用による分離

IC では最も一般的な分離モードである。これは、分析目的のイオンと、対イオンを有する官能基上に配位する溶離液のイオンとの間に生じる交換作用を利用したものであり、この交換作用と共に生じる官能基での吸脱着速度（分配速度）の差を利用にすることによってイオン同士を分離することができる。

陰イオンの交換分離には、第4級アンモニウム基やアミノ基などの正電荷をもつ官能基を修飾した陰イオン交換樹脂を固定相に用いる。溶離液は、サプレッサーを接続した導電率検出器では、炭酸緩衝液(NaHCO_3 と Na_2CO_3 の混合溶液)や強塩基(NaOH , KOH)等、強電解質の塩基が用いられることが多く、サプレッサーを接続していない導電率検出や紫外・可視検出器では、ホウ酸緩衝液や酢酸緩衝液等、極限イオン伝導率が低く、紫外光の吸収が低い化合物が用いられる。

陰イオンのイオン交換分離に用いる溶離液には pH を中性～弱塩基性に調整したものが多く、これは正に帯電した固定相に負に帯電したイオンを溶離液から絶え間なく供給し続けることによって化学平衡状態を維持するためである。すなわち、酸性の溶離液を用いると、溶離液の陰イオンの供給が少なくなり、分析目的の陰イオンが陰イオン交換基に保持される時間が長くなり、分析時間が長期化する。

陰イオン交換での分離機構を Fig. 3 に示す。陰イオン交換樹脂を充填したカラムに塩基性溶離液を通液すると、陰イオン交換樹脂の官能基は正に帯電する。そこに負に帯電したイオンが吸着されることによって分離が行われる。固定相に対する静電的吸着の強さは、イオンの価数や大きさに影響される。価数が大きいイオン、イオン径の大きいイオンほど強く保持されるため、溶出時間が遅くなる。正電荷を帯びるイオンは、静電的反発により固定相に保持されずにカラム内を通過する。

一方、陽イオン交換ではスルホ基やヒドロキシル基といった負電荷を帯びる官能基を修飾した陽イオン交換樹脂を固定相に用いる。溶離液には、導電率が低い有機酸を主とした酸性溶離液が多く用いられる。有機酸は分子量が大きいため、導電率が比較的低いためである。そのため、陽イオン交換による分離を行う際には、サプレッサーを使用しない場合が多い。

陽イオンのイオン交換分離に用いる溶離液の pH は有機酸を使用するため弱酸性であるが、リン酸イオンなど酸解離定数が複数ある性質を持つイオンを測定する場合、溶離液の pH によって解離状態が変化するため、検出したいイオンの形態に合わせて溶離液の pH を設定する必要がある。酸性溶離液を使用することで、負に帯電した固定相に陽イオンを断続的に供給し続けることができ、化学平衡状態を維持することができる。逆に、塩基性溶離液を用いた場合、固定相への陽イオンの供給が少なくなるため、試料陽イオンが固定相に保持される時間が長くなり、分析時間が長期化する。

陽イオン交換での分離機構を Fig. 4 に示す。陽イオン交換樹脂を充填したカラムに酸

性溶離液を通液することによって、陽イオン交換樹脂に修飾されている官能基が負に帯電する。そこに正に帯電した陽イオンが静電的吸着により分離される。静電的吸着の強さは、イオンの電荷数やイオン半径に依存し、負電荷を帯びるイオンは静電的反発によって吸着されることなくカラム内を通過する。

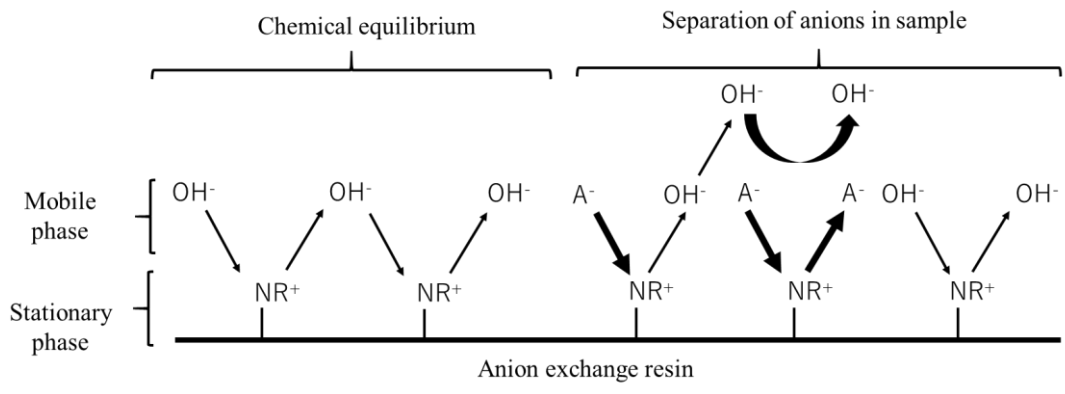


Fig. 3 Separation mechanism of anion exchange reaction

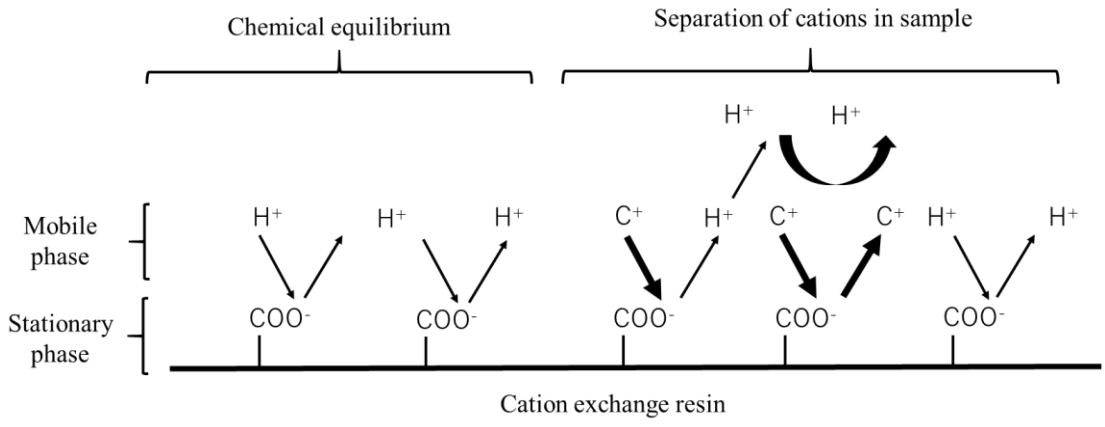


Fig. 4 Separation mechanism of cation exchange reaction

1.5.2. イオン排除作用による分離

イオン交換作用によるイオンの分離では、移動相中のイオンと固定相中の官能基間の静電的引力の差によって分離される。そのため、官能基と同符号の電荷をもつイオンは、静電的反発により排除される。しかし、イオン排除作用による分離では、官能基と同符号の電荷をもつイオンのうち、静電的反発の小さい弱酸や弱塩基性のイオンは固定相へ浸透することがある。これを利用したのがイオン排除型 IC である。ただし、この分離モードは、固定相と移動相との間に生じるイオンの排除および浸透作用を利用した分離とともに、イオンと固定相との疎水性相互作用や固定相に存在する細孔への物理的吸着が加味されるため、非常に複雑な分離機構である。また、強酸であってもイオン半径が大きく、水和が小さい陰イオンは負電荷の官能基を有する陽イオン交換樹脂相に浸透することもある。

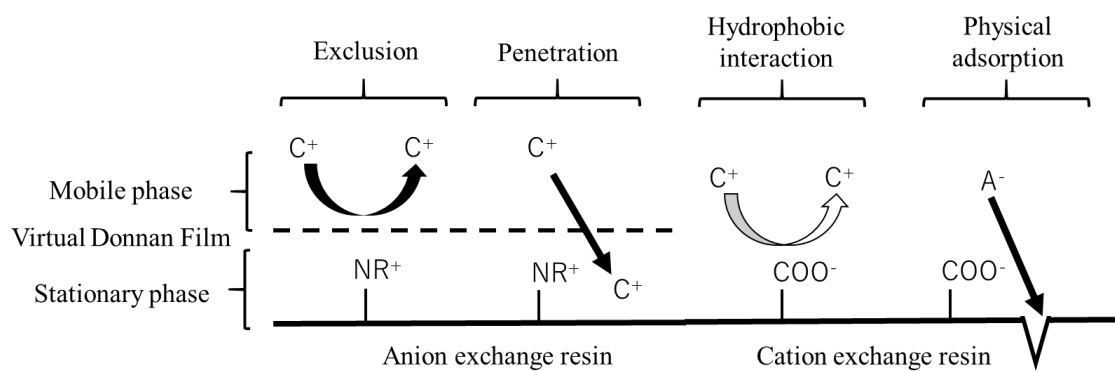


Fig. 5 Separation mechanism of anion exclusion reactions

1.5.3. イオン排除／陽イオン交換作用による分離

イオン排除／陽イオン交換クロマトグラフィーは、イオン排除作用と、上記のイオン交換作用を組み合わせた分離方法である。固定相には有機性樹脂ではなく無機のシリカもしくはジルコニアを用いる場合もある。

1.6. 水試料分析における IC の現状と課題

現在の IC システムを用いて水試料中の無機イオンを測定する際、前項の作用を用いて陰イオンと陽イオンを別々に測定するのが一般的であるが、①高価なカラム（イオン交換樹脂を充填剤としたカラムでは 20 万円前後）や検出器を複数購入する必要がある、②複数回に分けて測定を行う必要があるため、装置本体が 1 台しかない場合には測定に時間を要する（カラムの平衡化には 1 回の測定で通常 1～2 時間程度必要）といった課題がある。

これに加え、環境水のイオンバランス分析、河川水や農業用水中の無機窒素成分（正電荷のアンモニウムイオンと負電荷の亜硝酸イオン・硝酸イオン）など、電荷の異なる複数の試料イオンを測定する必要がある場面は多い。実際、2012 年から 2014 年まで筆者が行った森林生態系の窒素循環に関する研究において、河川水中の無機イオンの定量に IC を使用したが、8 種の無機イオンに対して測定条件を 3 通りに変えて分析を行う必要があった [23]。また、生体試料を扱う場合には実試料を多く確保できないこともあり、この場合には 1 回の測定で陰イオンと陽イオンを同時に測定するのが望ましい。

このような現状に対して、陰イオンと陽イオンを 1 回の測定で同時に定量する方法が開発されている。次項にこれまでに開発されてきた陰イオンおよび陽イオンの同時分離法について説明する。

1.7. 陰イオンと陽イオンの同時分離

1.7.1. 複数のカラムを直列または並列に接続する同時分離

これまで、陰イオン交換分離カラムと陽イオン交換分離カラムを直列または並列に接続することにより、陰イオンおよび陽イオンを同時定量する方法が開発されている [24-32]。Deguchi ら [25] は、陰イオン交換分離カラムおよび陽イオン交換分離カラムを直列接続し、2 種類の溶離液（2.5 mM 安息香酸 + 1.5 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン）を 2 つのポンプを用いて通液することにより、8 種の陰および陽イオンの同時

分離に成功している。また Amin ら [26] は、シングルインジェクションによる陰および陽イオンの分離に成功している。5-スルホサリチル酸を溶離液とし、並列接続した陰イオン交換分離カラムおよび陽イオン交換分離カラムに、6 ポートスイッチバルブ 2 つ、または 10 ポートスイッチバルブを併用することによって、8 種の無機イオンを分離しており、河川水への応用も行っている。Johns ら [27] は、3 本のカラムを直列に接続し、2 種類の溶離液を流速を変化させて 2 流路で通液することで、18 種類のイオンを分離している。これらの先行研究では、多岐に渡るイオン種の同時分離が可能であるものの、50~100 mm の分離カラムを複数接続することからカラム圧が高くなる傾向にあり、また溶出時間短縮や分離能向上のために数種類の溶離液を使用する、流速を何度も切り替える必要がある等、操作が煩雑になる点で課題が残る。

1.7.2. 一本の分離カラムを用いる同時分離

この方法は、① 陽イオンをキレート化して陰イオンに変化させ分離する方法 [33-35]、② 双性イオンを基材としてイオン交換作用を発現させる方法 [37-39]、③ 陰イオン交換樹脂と陽イオン交換樹脂を混合したものを充填剤としたカラムを用いる方法 [39]、④ 1 本のカラム内で異なる作用を発現させる方法 [41-44] の 4 通りに分類される。

方法①では、試料イオンの電荷を同じにすることによって同時分離を達成する。Ohta ら [36] は、陰イオン交換カラムに 0.5 mM トリメチル酸と 0.25 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の混合溶液を溶離液とし、間接紫外吸収検出法を用いることによって 5 種の陰イオン (HCO_3^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) と 2 種の陽イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+}) の分離に成功している。

方法②では、塩基性・酸性の両方の官能基を持つ双性イオン (双極イオン) を用いることで、陰および陽イオンの同時分離法を行う。Nesterenko ら [37] は、両性界面活性剤でコーティングした逆相固定相カラム (ODS カラム) を用いて、無機陰イオンと負に帯電したクエン酸およびシュウ酸の金属錯体 (Cl^- , IO_3^- , BrO_3^- , Br^- , NO_2^- , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Mn^{2+} , Cd^{2+}) を分離している。

方法③では、Pietrzyk ら [40] が 5 種の無機陰イオン (F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^-) および 4 種の無機陽イオン (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) について、1 種の溶離液・検出器を用いて同時分離を検討している。

方法④では、イオン排除作用とイオン交換作用の両方を同時に発現させる「イオン排除/陽イオン交換型クロマトグラフィー (IEC/CEC)」がある。Mori ら [42] は、ポリ

メタクリレートを基材とした弱酸性陽イオン交換樹脂の IEC/CEC 分離カラムに 15 mM 酒石酸と 2.5 mM 18 クラウン 6 エーテルの混合溶液を溶離液として使用することで、5 分以内で 3 種の無機陰イオン (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) と 5 種の陽イオン (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) の同時分離に成功している。これらの先行研究では、フッ化物イオンや亜硝酸イオン、リン酸イオンといった弱酸陰イオン同士の分離が課題となっている。

1.8. 本研究の目的

以上を踏まえ、本研究では環境水中に含まれる主要な無機イオンを対象とし、IC を用いた同時分離法の開発を目的とした。本研究における同時分離法とは、溶離液・カラム・検出器を測定中に変えることなく複数のイオン種を 1 回の測定で定量することができる、安価なカラムシステムのことを指す。これによって高価なカラムや検出器を複数用意する必要がなくなり、環境対策が未熟な開発途上国への IC の導入が容易になるとともに、食品分析・生体試料分析や、現在研究が進んでいるオンサイト測定用のポータブル IC にも応用される可能性がある。

本章の 1.8.1 の課題に対して、本研究では近年のイオン交換樹脂の性能向上に着目し、通常分離カラムの保護を目的として使用されるガードカラムと分離カラムを直列に接続することで、分離カラム 2 本を直列接続した場合よりもカラム圧力を抑えることができると考え、ガードカラムの分離カラムへの応用を検討した。このカラムの組み合わせに対する最適な溶離液条件を検討し、測定条件を変えずに電荷の異なる複数のイオンを定量することを狙った。結果は第 2 章に示す。

また本章の 1.8.2 の課題に対して、本研究ではイオン交換樹脂よりも安価に製造できるシリカゲルやジルコニアがフッ化物イオンに対して強い親和性を示すことに着目し、1 価の弱酸イオンを中心とした無機陰イオンの同時分離法の開発を行った。この結果を第 3 章と第 4 章に示す。

最後に、更に第 2 章から第 4 章までのまとめと今後の展望を第 5 章に示す。

本研究は、カラム充填剤と溶離液の組み合わせを最適化することによって同時分離法に関する新たな知見を得る内容となっている。

1.9. 参考文献

- [1] 大嶋俊一, 菅原庄吾, 杉山裕子, 千賀有希子, 藤永薫, 向井浩, 山田佳裕, 陸水環境化学, 共立出版株式会社, 東京都, まえがき(2017).
- [2] 環境基準, 環境省ホームページ: < <https://www.env.go.jp/kijun/> > <アクセス日 : 2020.01.06>
- [3] About the Sustainable Development Goals, the website of the United Nation: <<https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>> <アクセス日 : 2020.01.06>
- [4] 沖大幹, 小野田真二, 黒田かをり, 笹谷秀光, 佐藤真久, 吉田哲郎, SDGs の基礎, 学校法人先端教育機構 事業構想大学院大学出版部, 東京都, p.151-153 (2018).
- [5] 公益社団法人 日本分析化学会, 現場で役立つ水質分析の基礎, 株式会社オーム社, 東京都, p.10-11 (2012).
- [6] 小熊幸一, 上原伸夫, 保倉明子, 谷合哲行, 林英男, これからの環境分析化学入門, 株式会社講談社サイエンティフィク, 東京都, p.40-66 (2013).
- [7] E. Tyrrell, E. F. Hilder, R. A. Shalliker, G. W. Dicoski, R. A. Shellie, M. C. Breadmore, C. A. Pohl, and P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **1208**, 95-100 (2008).
- [8] 日本工業規格 JIS K 0127 「イオンクロマトグラフ分析通則」(2013); JIS K0102 「工業排水試験方法」(2008); JIS K 0553 「超純水中の金属元素試験法」(2002); 及び JIS K 0107 「排ガス中の塩化水素分析方法」(2002).
- [9] P. R. Haddad, and P. E. Jackson (Eds.), *Ion Chromatography-Principles and Application*, Elsevier, Amsterdam, p. 6 (1997).
- [10] 岡田哲夫, 山本敦, 井上嘉則, クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京都, p. 3 (2010).
- [11] H. Small, W. C. Bauman, and T. S. Steavens, *Anal. Chem.*, **47**, 1801-1809 (1975).
- [12] J. S. Fritz, and D.T. Gjedge, "Ion Chromatography, 3rd edition" Wiley VCH, Weinheim, p. 1 (2000).
- [13] JIS K 0127 イオンクロマトグラフィー分析通則 (2001).
- [14] J. S. Fritz, D.T. Gjedge, and R. M. Becker, *Anal. Chem.*, **52**, 9, 1519-1522 (1980).
- [15] M. Mori, K. Sagara, K. Arai, N. Nakatani, S. Ohira, K. Toda, H. Itabashi, D. Kozaki, Y. Sugo, S. Watanabe, N. S. Ishioka, and K. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **1431**, 131-137 (2016).
- [16] 佐藤真治, 植田幹夫, 三苫惠民, *Tosoh Research & Technology Review*, 48, pp. 43-46

(2004)

- [17] K. E. Maudens, G. F. Zhang, and W. E. Lambert, *J. Chromatogr. A*, **1047**, 85-92 (2004).
- [18] K. H. Al-Assaf, J. F. Tyson, and P. C. Uden, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **24**, 4, 376-384 (2009).
- [19] Y. Horioka, S. Kurata, and K. Ito, *BUNSEKI KAGAKU*, **63**, 8, 657-663 (2014).
- [20] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, T. Tomiyasu, and Y. Komatsu, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3163-3167 (2009).
- [21] B. Horstkotte, P. Jarosova, P. Chocholous, H. Sklenarova, and P. Solic, *Talanta*, **136**, 75-83 (2015).
- [22] H. J. Kim, and Y. K. Kim, *Anal. Chem.*, **61**, 14, 1485-1489 (1989)
- [23] S. Yoshii, A. Iijima, M. Mori, and H. Itabashi, *BUNSEKI KAGAKU*, **66**, 1, 49-54 (2017).
- [24] K. Tanaka, T. Ishizuka, and H. Sunahara, *J. Chromatogr.*, **174**, 1, 153-157 (1979).
- [25] K. Deguchi, K. Kohda, and M. Ito, *J. Chromatogr. A*, **845**, 165-170 (1999).
- [26] M. Amin, L. W. Lim, and T. Takeuchi, *Talanta*, **71**, 1470-1475 (2007).
- [27] C. Johns, R. A. Shellie, C. A. Pohl, and P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6931-6937 (2009).
- [28] H. Small, and T. E. Miller, *Anal. Chem.*, **54**, 462-469 (1982).
- [29] Z. Iskandarani, and T. E. Miller, *Anal. Chem.*, **57**, 1591-1594 (1985).
- [30] D. C. Gan, and J. G. Tarter, *J. Chromatogr.*, **404**, 285-291 (1987).
- [31] D. Connolly, D. Victory, and B. Paull, *J. Sep. Sci.*, **27**, 912-920 (2004).
- [32] R. Wang, N. Wang, M. Ye, and Y. Zhu, *J. Chromatogr. A*, **1265**, 186-190 (2012).
- [33] Y. Fa, Y. Yu, F. Li, F. Du, X. Liang, and H. Liu, *J. Chromatogr. A*, **1554**, 123-127 (2018).
- [34] K. Ohta, K. Tanaka, and J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A*, **731**, 179-186 (1996).
- [35] K. Ohta, and K. Tanaka, *Anal. Chim. Acta*, **373**, 189-195 (1998).
- [36] M. Yamamoto, H. Yamamoto, Y. Yamamoto, S. Matsushita, N. Baba, and T. Ikushige, *Anal. Chem.*, **56**, 832-834 (1984).
- [37] E. P. Nesterenko, P. N. Nesterenko, and B. Paull, *J. Chromatogr. A*, **1213**, 62-69 (2008).
- [38] T. Takeuchi, Safni, and T. Miwa, *LC GC. North America*, **18**, 418 (2000).
- [39] C. Crafts, B. Bailey, M. Plante, and I. Acworth, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 534-539 (2009).
- [40] D. J. Pietrzyk, and D. M. Brown, *Anal. Chem.*, **58**, 2554-2557 (1986).
- [41] K. Tanaka, K. Ohta, J. Fritz, S. Matsushita, and A. Miyanaga, *J. Chromatogr. A*, **671**, 239-248 (1994).
- [42] M. Mori, T. Hironaga, T. Satori, H. Itabashi, N. Nakatani, D. Kozaki, and K. Tanaka, *TETSU to HAGANE*, **97**, 273-278 (2011).
- [43] M. Mori, K. Tanaka, M. I. H. Helaleh, Q. Xu, M. Ikedo, Y. Ogura, S. Sato, W. Hu, K.

Hasebe, and P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **997**, 219-224 (2003).

- [44] K.P. Lee, S. H. Choi, Y. C. Park, Z. U. Bae, M. S. Lee, S. H. Lee, H. Y. Chang, S. M. Kwon, and K. Tanaka, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **24**, 1324-1328 (2003).

第2章 陰イオン分離 IC における分離カラムとしての陰イオン交換ガードカラムの利用と無機陰および陽イオン同時分離法への応用

2.1. 緒言

第1章の1.8で述べたように、これまでに開発されてきた無機イオンの同時分離法にはカラム圧力の上昇や煩雑な操作性といった課題が残っている。これを踏まえ、本章では2本のカラムを直列に接続する方法に着目し、ガードカラムを活用した同時分離法の開発を行った。イオン交換分離カラムと同径のイオン交換樹脂が充填されたガードカラムは、一般的に可溶性不純物の除去および分離カラムの保護を目的として使用される。近年、樹脂の微粒化と物理的強度の増長によりガードカラムの性能は著しく向上している。従って、分離カラム長が短いガードカラムのみでも溶離液条件を操作することによって十分な分離が期待できる。また、ガードカラムは分離カラムの約10分の一の価格で購入することができるため、1.8.1.で述べたような複数の分離カラムを用いる同時分離法と比較して安価で済む。

そこで本研究では、陰イオン交換ガードカラムと陽イオン交換分離カラムの2本を直列に接続することで、1種類の溶離液、1回の試料注入での陰および陽イオンの同時分離法の開発を行った。Elkin は陰イオン交換ガードカラムを分離カラムとして導入した小型クロマトグラフの開発を報告している [1] が、強塩基性溶離液（ ~ 25 mM KOH）だったため、陰イオンの分離能が低い結果となっていた。そこで、試料陰イオンの陰イオン交換基への静電的吸着を上げ分離能を改善するために、本章では溶離液に弱酸性の有機酸溶液を用いた。通常であれば陰イオン交換樹脂を固定相とするカラムに対しては塩基性溶離液を用いるが、これは陰イオン交換基の試料陰イオンに対する吸着力を弱め、高速で分離分析を行うためである。しかし、長さ15 cm程度 of 分離カラムとは異なり、ガードカラムは1 cmと短く、充填される陰イオン交換樹脂量は極端に少なくなる。その結果、溶質のイオン交換樹脂相に対する分配度も少なくなるため、塩基性溶離液での高分離能分析は困難である。そのため、今回の実験では試料陰イオンと固定相上の陰イオン交換基との静電的吸着を強くし、陰イオンの分離能改善を試みた。本研究では、初めに陰イオン交換ガードカラムと酸性溶離液の組み合わせで陰イオンの分離能を確認し、最適な溶離液条件を調べた後に陽イオン交換分離カラムを接続し、陰および陽イオンの分離を試みた。

2.2. 実験

2.2.1 装置

イオンクロマトグラフは、溶離液ポンプ、カラムオーブン、導電率検出器、オートサンプラーを搭載した東ソー株式会社製 IC-2001 を用いた。溶離液の流速は 0.4~1.5 mL/min, カラムオーブン温度は 40 °C, 試料注入量は 30 μ L とした。

2.2.2. カラム

本研究では、陰イオン交換容量 (0.2~30 meq/mL), 粒子径 (3~5 μ m), およびカラムサイズ (10 mm \times 2.1 mm i.d. ~ 10 mm \times 4.6 mm i.d.) が異なる陰イオン交換ガードカラムを検討した。先行研究 [2] にて、陰イオン交換容量 30 meq/mL, 粒子径 < 4 μ m のガードカラムに 4 mM 酒石酸を使用することで良好な試料陰イオンの分離を得ていることから、ポリメタクリレート系強塩基性陰イオン交換樹脂を基材とする TSKgel guard column SuperIC-AZ (AZG: 10 mm \times 4.6 mm i.d., 粒子径 4 μ m, 陰イオン交換容量 30 meq/L, 東ソー株式会社製) と, ポリビニルアルコール系強塩基性陰イオン交換樹脂を基材とする TSKgel guard column SuperIC-A HS (HSG: 10 mm \times 4.6 mm i.d., 粒子径 3.5 μ m, 陰イオン交換容量 30 meq/L, 東ソー株式会社製) の 2 種類を本研究にて検討するガードカラムとした。

また、陰および陽イオンの同時分離法の開発で使用した陽イオン交換分離カラムは、ポリスチレンジビニルベンゼン系弱酸性陽イオン交換樹脂を基材とする Tosoh TSKgel Super IC-CR column (CRS: 150 mm \times 4.6 mm i.d., 粒子径 3 μ m particle, 陽イオン交換容量 1.0 meq/L, 東ソー株式会社製) を用い、陰イオン交換ガードカラムの直後に接続した。同時分離法のカラムシステムの模式図を Fig. 1 に示す。

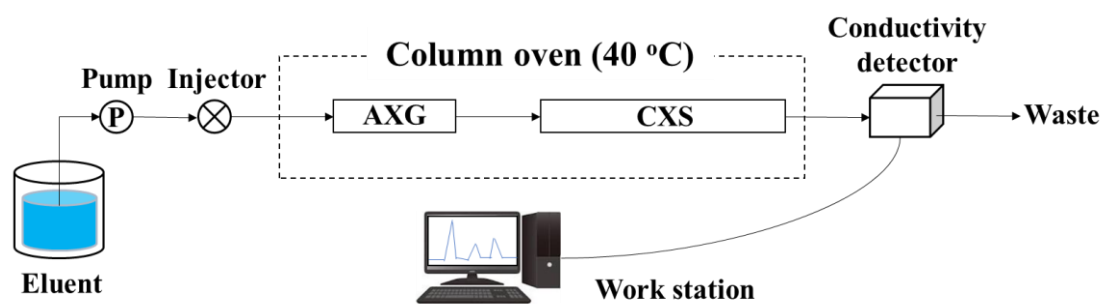


Fig. 1 Schematic illustration of simultaneous separation ion chromatographic mode.

2.2.3. 試薬

標準試料と溶離液の調製には、和光純薬工業製の特級試薬を使用した。溶液は 0.1 mM になるよう純水で溶解し、必要に応じて希釈した。調製に用いた純水は Merck Millipore 社製 Sim Pak を搭載した Millipore Simpli Lab から精製されたものを使用した。無機イオン (NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂) の混合溶液を標準試料とし、濃度は適宜変化させた。溶離液に用いた有機酸は 5-スルホサリチル酸, 酒石酸, リンゴ酸, フタル酸および安息香酸であり、標準試料と同様に調製した。

2.2.4. 添加回収実験

本章のカラムシステムの分析性能を評価するために添加回収実験を行い、式 (1) を用いて添加回収率を算出した。

$$\text{添加回収率 (\%)} = \frac{(\text{実試料に標準試料を添加した試料のピーク面積} - \text{実試料中陰イオンのピーク面積})}{\text{標準試料中陰イオンのピーク面積}} \times 100$$

ここで用いた実試料は、人為汚染の影響が小さい山岳地域 (群馬県上野村) と下水等により人為汚染の影響が大きい都市部 (群馬県高崎市) を流れる利根川水系河川にて採取した河川水を用いた。採取地点を Fig. 2 に示す。ポリプロピレン製ボトルで直接採取し、0.45- μm のシリンジフィルターでろ過した後、4°C で冷蔵保存した。室温 (25 \pm 3 °C) に戻したものを実試料とし、希釈などの前処理はせず直接試料注入を行った。

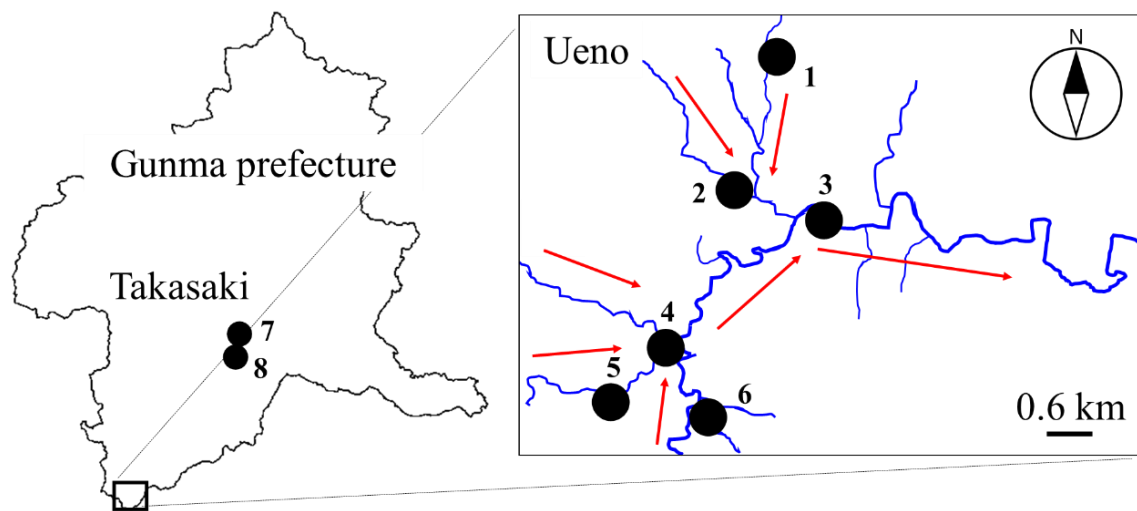


Fig. 2 Map of river water sampling points

2.3. 結果と考察

2.3.1. 陰イオン交換ガードカラムによる陰イオン分離

2種類の陰イオン交換ガードカラム (AZG と HSG) による試料陰イオンの分離挙動を、溶離液中の酸の種類 (5-スルホサリチル酸 (SSA), 酒石酸 (TA), リンゴ酸 (MA), フタル酸 (PA), 安息香酸 (BA)) を変化させ比較した。HSG を用いた場合の溶離液中酸濃度に対する試料陰イオンの保持容量 (V_R) のグラフを Fig. 3 に示す。溶離液中酸濃度の増加に伴い V_R は減少する。これは固定相で正に帯電する陰イオン交換基 (第4級アンモニウム基) に対して試料陰イオンと溶離液中陰イオンが競合するためである。試料陰イオンの溶出順は一般的な IC のカラムシステムと同様だった。

特に SO_4^{2-} は溶離液種類に大きく影響を受けた。MA と BA は弱酸溶離液であり、溶出力が弱いために SO_4^{2-} を 60 分以内に溶出できなかった。TA と PA は MA や BA と比較して強い酸性溶離液のため、 SO_4^{2-} を 60 分以内に溶出することができた。

強酸性溶離液である SSA を用いた場合には、陰イオンの V_R は大きく減少し、分離能の低下を招いた。陰イオンの分離挙動は溶離液の溶出力に依存するが、これは溶離液中の酸固有の酸解離定数 pK_a によって変わってくる。SSA のような強酸性溶離液を用いる場合、陰イオンの分離挙動をコントロールすることは困難であった。一方、BA または MA のような弱酸性溶離液は陰イオンの良好な分離を得ることができるが、2価陰イオンを分離することができなかった。

以上の結果は、ポリメタクリレート系陰イオン交換樹脂が充填された AZG を用いた場合でも同様となった (Fig. 4) が、全体の分離能が良好だった HSG と TA, MA の組み合わせで以降の実験を行うこととした。

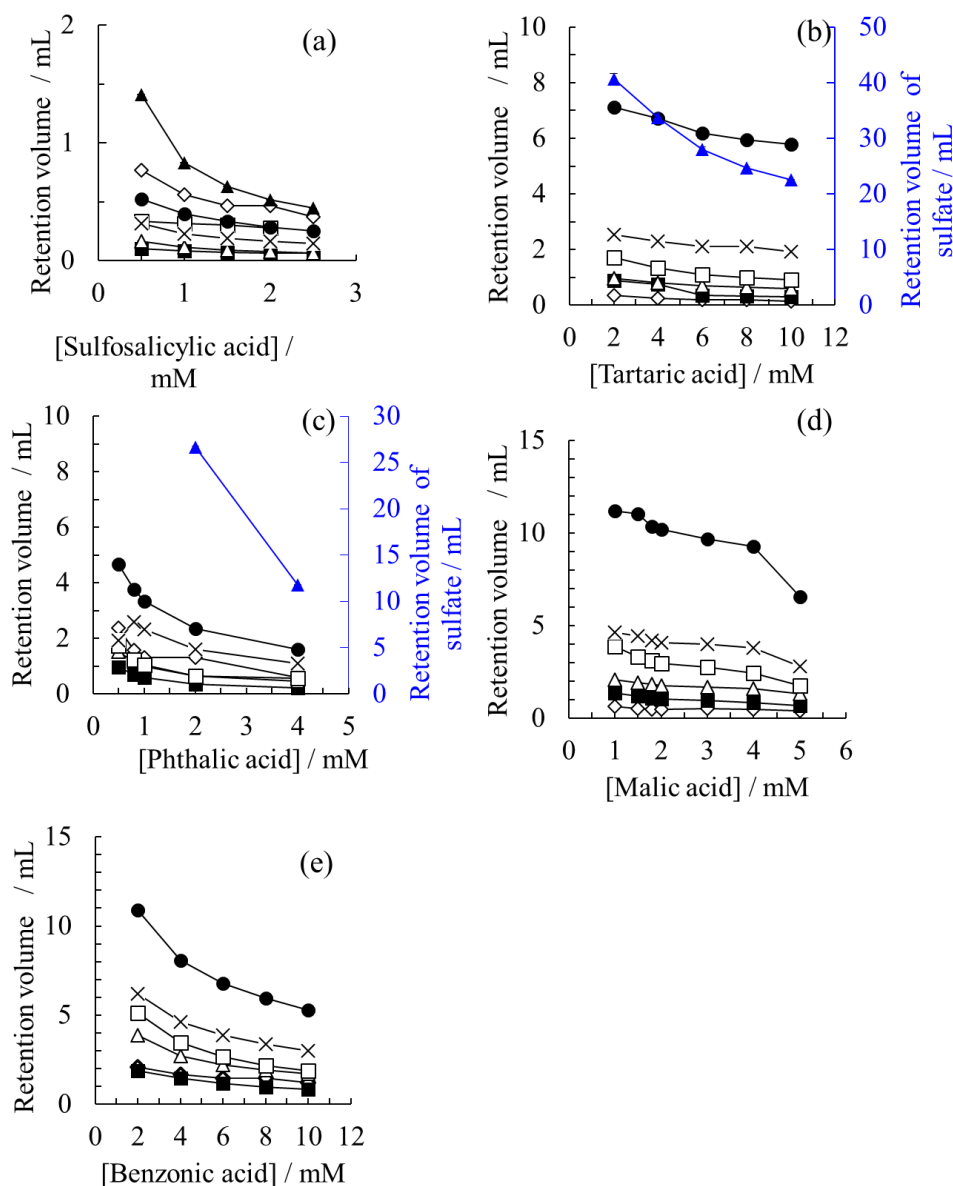


Fig. 3 Changes in retention volumes as functions of acid concentrations in the eluent. Column: TSKgel guard column SuperIC-A HS (HSG: 10 mm × 4.6 mm i.d., 30 meq/L-capacity and 3.5 μm particle). Eluent: (a) sulfosalicylic acid, (b) tartaric acid, (c) phthalic acid, (d) malic acid and (e) benzoic acid. Flow rate: 0.8 mL/min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Injection volume: 30 μL . Column temperature: 40 °C. Plot identities: (◇) elution dip, (■) F⁻, (△) H₂PO₄⁻, (□) NO₂⁻, (×) Cl⁻, (●) NO₃⁻ and (▲) SO₄²⁻. Other separation conditions are described in the experimental section.

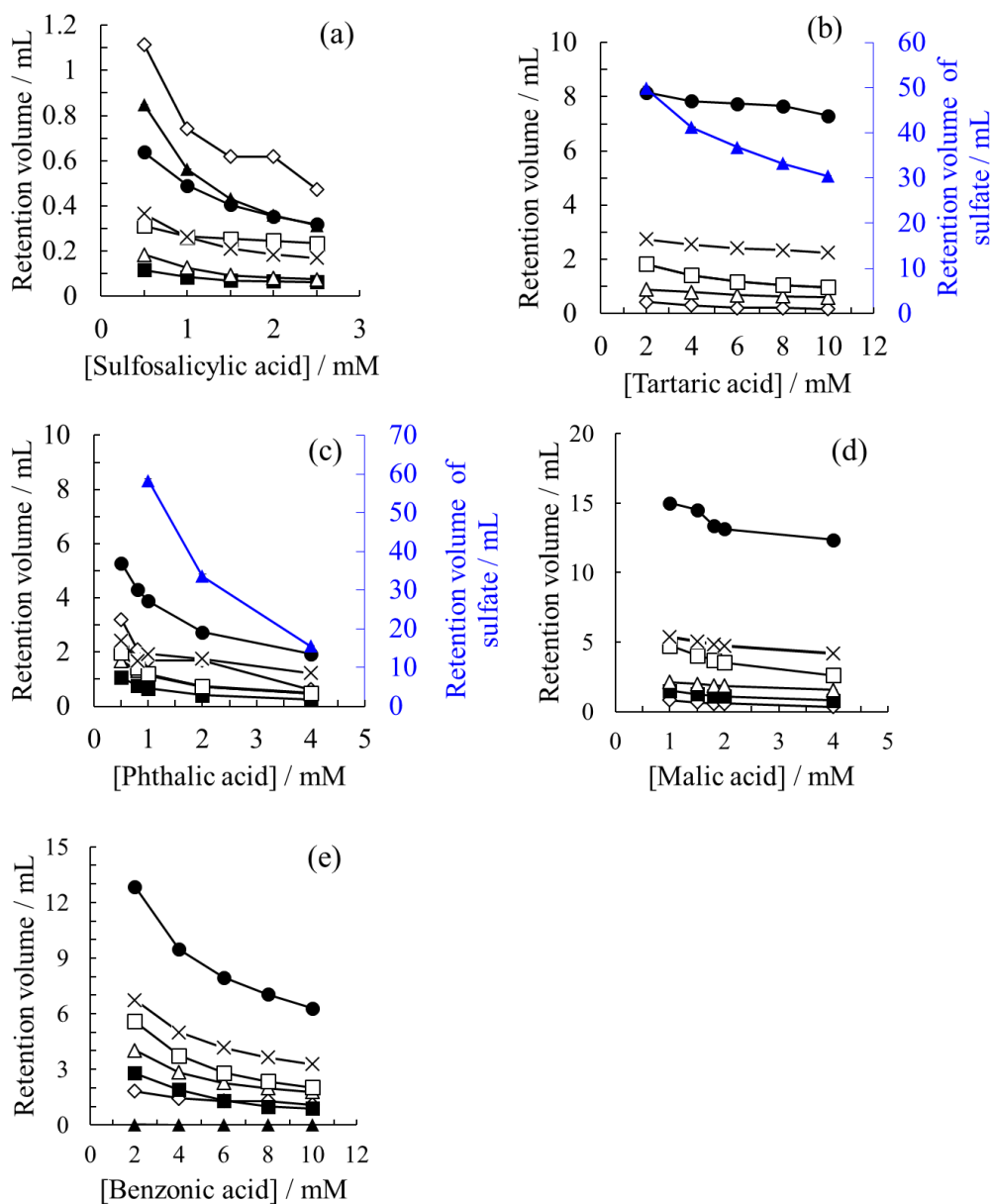


Fig. 4 Changes in retention volumes as functions of acid concentrations in the eluent.

Column: TSKgel guard column Super IC-AZ (AZG: 10 mm × 4.6 mm i.d., 30 meq/L-capacity and 4 μm particle). Eluent: (a) sulfosalicylic acid, (b) tartaric acid, (c) phthalic acid, (d) malic acid, and (e) benzoic acid. Flow rate: 0.8 mL/min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Plot identities: (◇) elution dip, (■) F⁻, (△) H₂PO₄⁻, (□) NO₂⁻, (×) Cl⁻, (●) NO₃⁻ and (▲) SO₄²⁻. Other separation conditions are described in the experimental section.

次に、試料イオンの保持容量 k' を溶離液中陰イオン（酒石酸塩およびリンゴ酸塩）と比較した。 k' の \log 値と溶離液中陰イオン濃度の \log 値から導いた近似曲線の傾きは、 $-0.40 \sim -0.13$ となった（Fig. 5 および Table 1）。試料陰イオン—溶離液中陰イオン間の相互作用が陰イオン交換作用である場合、理論上の傾きは 1 価陰イオンでは -1 に、2 価陰イオンでは -2 に近くなる。なぜなら、本研究では酒石酸およびリンゴ酸が 1 価陰イオンに解離する pH 条件で実験を行っているからである [3]。しかし、上述した近似曲線の傾きは理論値とかけ離れていた（ $-0.13 \sim -0.40$, Table 1）。強酸性陰イオン (Cl^- , NO_3^-) の傾きは、弱酸性陰イオン (F^- , NO_2^-) の傾きと比較して小さい結果となり、この結果は酸性溶離液の種類に依存しなかった。

以上から、試料陰イオンに対しては静電的な陰イオン交換作用だけでなく、官能基を吸着させている基材に対する浸透作用も発現しており、そのために陰イオン交換ガードカラムと弱酸の有機酸溶液の組み合わせでも陰イオンを十分に分離することができたと考えられる。

また、このときのカラム圧力は $1.6 \sim 2.6 \text{ MPa}$ であり、一般的な分離カラムでの圧力（ 10 MPa 前後）と比較して非常に低い圧力だった。

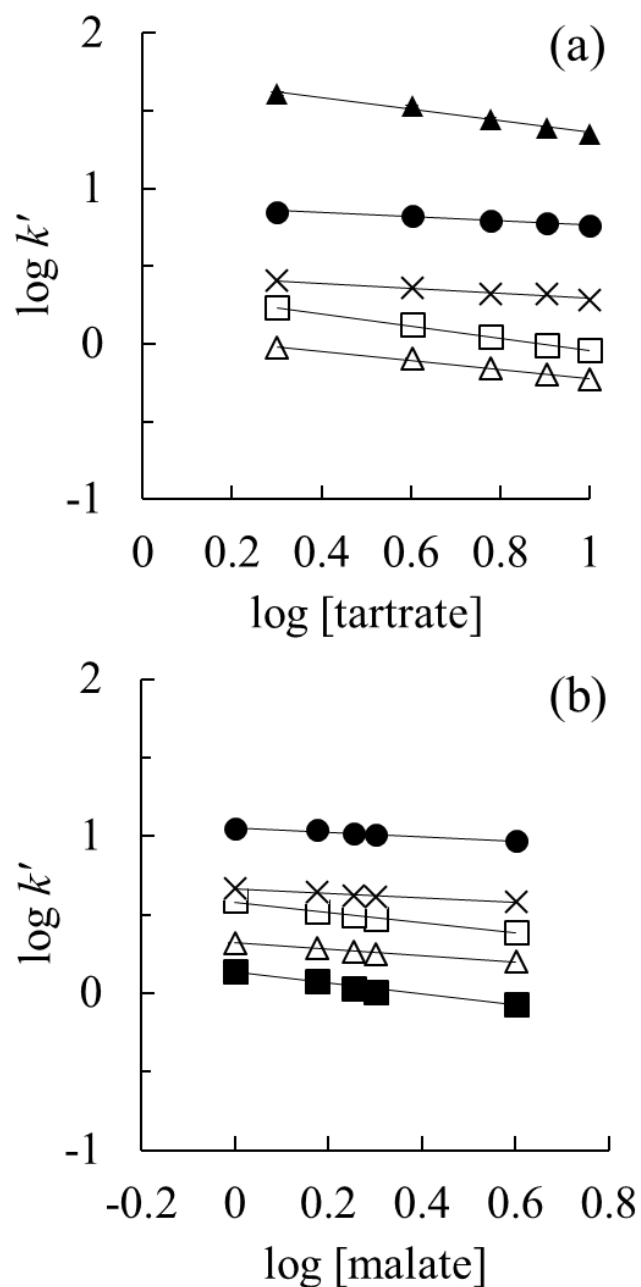


Fig. 5 The log plots between retention capacity k' and concentration of eluent anions. Column: HSG. Eluent anion: (a) tartrate and (b) malate. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Flow rate: 0.8 mL/min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Injection volume: 30 μ L. Column temperature: 40 °C. Plot identities: (■) F⁻, (Δ) H₂PO₄⁻, (\square) NO₂⁻, (\times) Cl⁻, (●) NO₃⁻ and (\blacktriangle) SO₄²⁻. Other conditions are the same as in Fig. 3.

Table 1 Approximate equations and correlation coefficients (r^2) of analyte anions obtained from $\log k'$ and \log [eluent anion].

Eluent anion	Analyte anions	Approximate equation	Correlation coefficient, r^2
Tartrate	H_2PO_4^-	$y = -0.29x + 0.07$	0.9965
	NO_2^-	$y = -0.40x + 0.35$	0.9985
	Cl^-	$y = -0.16x + 0.46$	0.9506
	NO_3^-	$y = -0.13x + 0.90$	0.9707
	SO_4^{2-}	$y = -0.37x + 1.73$	0.9858
Malate	F^-	$y = -0.35x + 0.13$	0.9746
	H_2PO_4^-	$y = -0.20x + 0.32$	0.9883
	Cl^-	$y = -0.15x + 0.67$	0.9668
	NO_2^-	$y = -0.33x + 0.58$	0.9909
	NO_3^-	$y = -0.15x + 1.06$	0.9500

更に、溶離液の流速を 0.4~1.5 mL/min (カラム圧力 1.0 ~ 3.3 MPa) に変化させ、陰イオン分離への影響を調べた。Fig. 6 に流速を変化させたときの理論段高さ (height equivalent of one theoretical plate : H) (Fig. 6a) およびシグナルノイズ比 (Signal-to-noise ratio : S/N) (Fig. 6b) を表す。

H はカラム長に関係なくカラム性能や充填剤の分離能を表すもので、値が低いほどカラム性能が良いとされる。式 (2) から算出する。ここで、 L はカラム長さ、 N は理論段数 (Number of theoretical plate) である。 N は式 (3) の保持時間 (t_r)、ピーク幅 (W) より算出する。

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{W}\right)^2 \quad (3)$$

その結果、 NO_3^- は 0.6 mL/min、それ以外の陰イオンは 0.8 mL/min で最小値を示し、それよりも速い流速では微増した。この結果から、流速が遅すぎるとカラム内を通過する試料陰イオンが拡散しピークがブロード化し、理論段数が低くなる (結果として H は高い値を示す) が、一方で流速が早すぎるとカラム内でのイオン交換の化学的平衡 (移動相から固定相への物質の分配) が十分な状態にならないまま試料イオンがカラムを通過してしまい、理論段数が低くなる (結果として H が高くなる) ことが分かった。

S/N は、検出イオンのピーク高さ (Signal, S) を、ピークが検出されていないベースラインノイズの変動の高さ (Noise, N) で割ることで算出する。 S/N の値が大きいほど、 S と N の区別が明確にできていることになり、優れた検出感度が得られる。 S/N は Fig.6b に示されるように、分析対象となったイオンいずれも流速 0.8 mL/min において最大値を示した。これは N が 0.4 mL/min から 0.8 mL/min までは 0.048 ~ 0.053 μS と低かったのに対し、1.0 mL/min から 1.5 mL/min では 0.087 ~ 1.5 μS と増加したことに起因している。

以上の結果から、本法の溶離液流速は 0.8 mL/min が最適であると考えられるが、実際は検出されるイオン間の分離能も考慮しなければならず、その結果、 S/N は多少劣るものの、良好な理論段高さ示したことや全体の分離能を考慮して 0.6 mL/min を最適な流速と結論付けた。

また、陰イオンの分離能と全体の溶出時間を考慮して、TA および MA の陰イオン分離に対する最適濃度はそれぞれ 8 mM および 4 mM と結論付けた。Fig. 7 にこれらの溶離液を用いたときのクロマトグラムを示し、分析性能は Table 2 にまとめた。このときの陰イオンの定量下限値 (Limit of quantification: LOQ) は数 μ M レベルだったことから、陰イオン交換ガードカラムと酸性溶離液の組み合わせでも河川水や雨水といった環境水中の陰イオンを定量可能と考え、次項では環境水に本法を応用した。

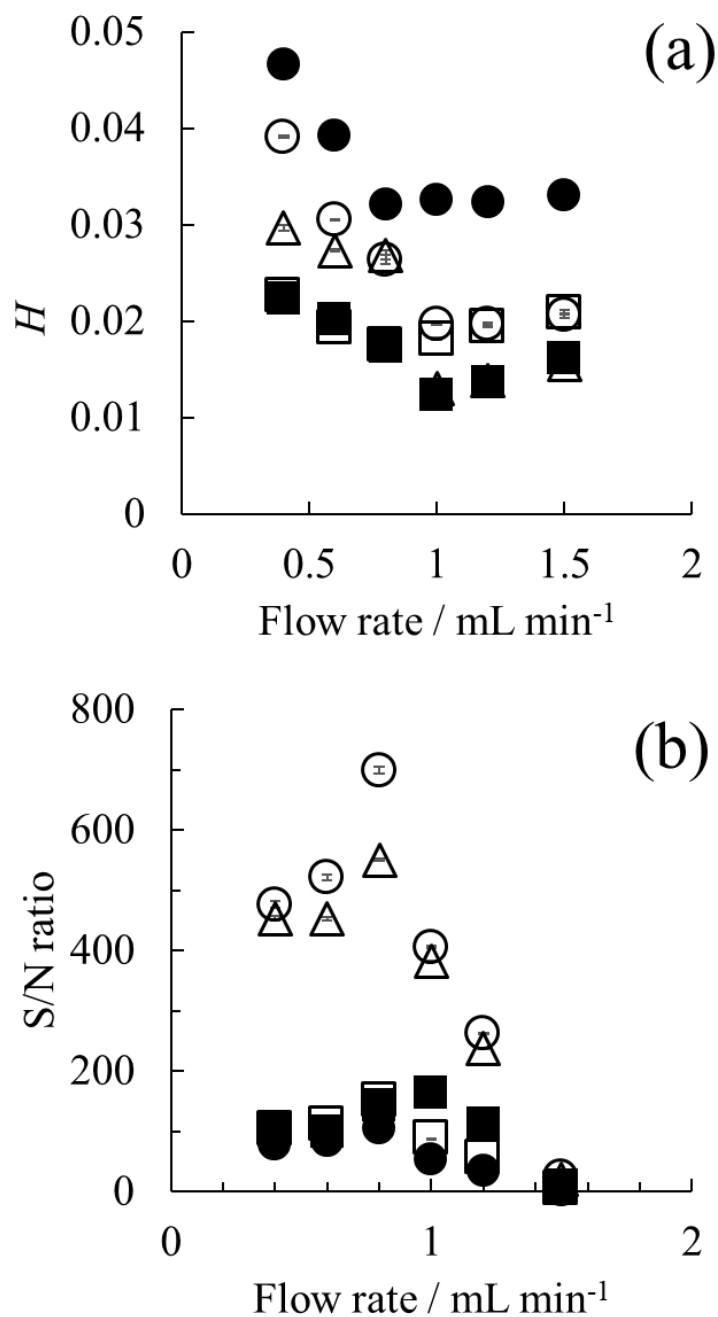


Fig. 6 The plots between flow rate and (a) height of theoretical plate, and (b) S/N ratio. Column: HSG. Eluent anion: 4 mM malate. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Injection volume: 30 μ L. Column temperature: 40 $^{\circ}$ C. Plot identities: (■) F⁻, (Δ) H₂PO₄⁻, (\square) NO₂⁻, (\times) Cl⁻, (\bullet) NO₃⁻ and (\blacktriangle) SO₄²⁻. Other separation conditions are described in the experimental section.

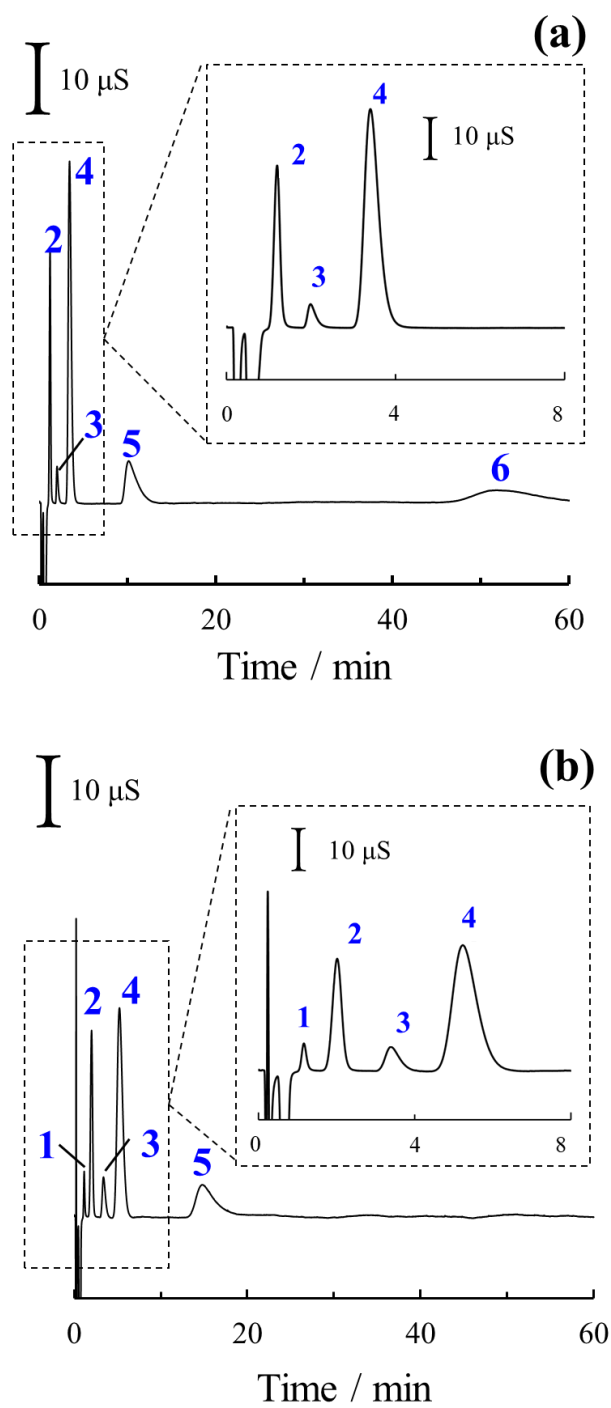


Fig. 7 Typical chromatograms of anions on an AXG by elution of (a) 8 mM tartaric acid and (b) 4 mM malic acid. Column: HSG. Flow rate: 0.6 mL/min. The upper-right portion of each chromatogram is an enlargement of the chromatogram from 0 to 8 min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Peak identities: (1) F⁻, (2) H₂PO₄⁻, (3) NO₂⁻, (4) Cl⁻, (5) NO₃⁻ and (6) SO₄²⁻. Other conditions are the same as in Fig. 3.

Table 2 Analytical performance of analyte anions obtained by an anion-exchange guard column with 8 mM tartaric acid (TA) and 4 mM malic acid (MA)

Eluent	Analytes	Approximate ^a	Correlation coefficient, r^2	RSD ^b , peak area, % (n = 3)	RSD, retention time, % (n = 3)	LOD ^c , at S/N=3 ^d / μM	LOQ ^e / μM
8 mM TA	H ₂ PO ₄ ⁻	$y = 33.90x + 1.10$	0.9958	0.5	0.1	4.3	14.3
	Cl ⁻	$y = 42.40x + 0.30$	0.9991	0.4	0.1	4.7	15.7
	NO ₂ ⁻	$y = 3.15x + 0.04$	0.9995	3.0	0.2	3.7	12.3
	NO ₃ ⁻	$y = 4.40x + 0.06$	0.9992	1.8	0.6	5.7	19.0
	SO ₄ ²⁻	$y = 2.11x - 0.04$	0.9992	1.5	0.9	10.8	36.0
4 mM MA	F ⁻	$y = 10.50x + 0.20$	0.9985	1.0	0.3	2.1	7.0
	H ₂ PO ₄ ⁻	$y = 24.20x + 0.70$	0.9964	0.3	0.4	4.1	13.7
	Cl ⁻	$y = 24.90x + 0.10$	0.9994	0.4	0.5	3.5	11.7
	NO ₂ ⁻	$y = 4.64x + 0.07$	0.9989	0.5	0.4	6.9	23.0
	NO ₃ ⁻	$y = 3.13x + 0.04$	0.9989	1.9	1.0	3.9	13.0

^a Concentration range was from 0.05 mM to 1 mM.

^b RSD: relative standard deviation. The data were estimated from triplicate measurements.

^c LOD: limitation of detection. The concentration of analyte anions used to estimate the LOD was 0.05 mM.

^d S/N = 3: signal-to-noise ratio of 3.

^e LOQ: limitation of quantification. $\text{LOQ} = 3.3 \times \text{LOD}$.

2.3.2. 実試料への応用

河川水に含まれる陰イオン濃度を，上述の最適条件によって求めた．Fig. 8 に，河川水を分析した際のクロマトグラムを示す．図中の点線は，実線で表されている河川水試料に，0.05 mM の標準試料を添加したものを測定した際に得られたクロマトグラムである．式 (1) を用いて添加回収実験により求めた回収率は，Cl⁻で 101.5%，NO₂⁻で 92.5%，NO₃⁻で 108.9%，SO₄²⁻で 103.9%であり，陰イオン交換ガードカラムと酸性溶離液の組み合わせで，通常分離カラムよりも低いカラム圧にて環境水試料中の陰イオンの定量が可能であることが確認できたため，次項では陽イオン交換分離カラムを直列に接続し，陰および陽イオンの同時分離法の開発を行うこととした．

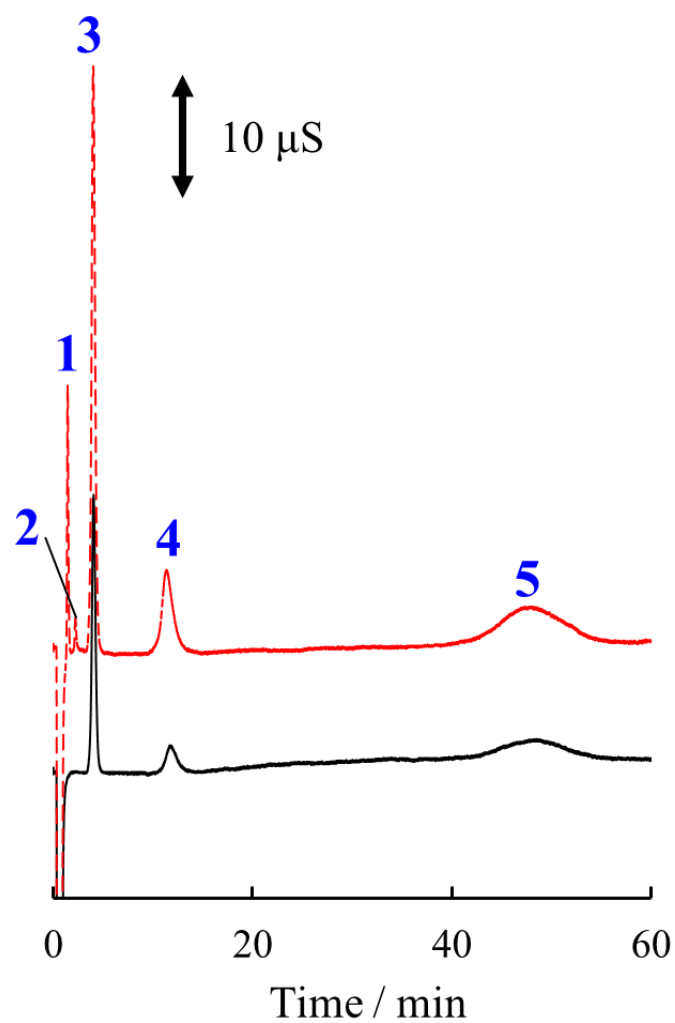


Fig. 8 Chromatograms of anions in a river water sample. Column: HSG. Eluent: 8 mM tartaric acid. Peak identities: (1) H_2PO_4^- , (2) NO_2^- , (3) Cl^- , (4) NO_3^- and (5) SO_4^{2-} . The dotted red line indicates the chromatogram when the spiked standard solution was added to the river water samples (0.05 mM each for analyte ions). Other conditions are the same as in Fig. 3.

2.3.3. 陰イオン交換ガードカラムと陽イオン交換分離カラムの組み合わせによる陰および陽イオンの同時分離定量

次に、陰イオン交換ガードカラム HSG の後に陽イオン交換分離カラム CRS を直列接続した場合の陰および陽イオンの分離挙動を調べた。溶離液は 2.3.2. で用いた 8 mM TA および 4 mM MA とした。得られたクロマトグラムを Fig. 9 (a)(c) に示す。陰イオン交換ガードカラムのときと同様に、 SO_4^{2-} は 8 mM TA (Figure 9 (a)) では 50 分以内に溶出でき、4 mM MA (Figure 9 (c)) では 60 分以内に検出することができなかった (Fig. 9(c))。

1 価陽イオンの良好な分離能を得ることができなかったため、 K^+ と NH_4^+ を選択的に包接する 18 クラウン 6 エーテル (18C6) を溶離液に添加した [4-6]。その結果を Fig. 9 (b)(d) に示す。どちらの溶離液においても 1 価陽イオンの分離能を大幅に改善することができた。特に、8 mM TA (Figure 9 (b)) では 17 分以内に 7 種の無機イオンを分離することができた。一方 4 mM MA (Figure 9 (d)) では、8 mM TA (Figure 9 (b)) では分離することができなかった 1 価の弱酸イオンの F^- と H_2PO_4^- を分離することができ、測定時間 50 分の間で 9 種の無機イオンの分離が可能となった。

Table 3 に 8 mM TA と 0.5 mM 18C6 の混合溶液を溶離液とした場合 (Figure 9 (b)) の分析性能評価の結果を示す。3 回測定の結果から導き出した保持時間の RSD は全ての分析対象イオンが 1% と良好な結果であり、先行研究 [7, 8] と比較しても同等だった。ピーク面積の RSD も全体的に良好な結果だった。

また、カラムを直列に接続しグラジエントモードにて測定を行なっている同時分離法の先行研究 [7, 8] のカラム圧力 1.5 ~ 2.3 MPa と比較して本法でのカラム圧力は 8.0 MPa 前後と高くなったが、これは本法で使用した陽イオン交換分離カラム単体のカラム圧が流速 0.6 mL/min でも 7 MPa 以上と高いことに起因している。

Fig. 9 では、陽イオンのうち、18C6 に包接される K^+ 、2 価の Mg^{2+} と Ca^{2+} の 3 種のイオンは MA ではピークがブロードし、TA では MA と比較してブロードが抑制された。これは、MA が TA よりも弱い酸である (第一酸解離定数 pK_a は MA で 3.4, TA で 2.87) ために、陽イオン交換分離カラムの陽イオン交換樹脂に対して試料陽イオンが強く吸着されたためと考えられる。また、TA は Mg^{2+} や Ca^{2+} に対する安定度定数が MA よりも高く、カラム内でこれらの 2 価陽イオンと錯形成することによって陽イオン交換基への静電的吸着を弱め、速く溶出させることができる。したがって、2 価陽イオンのピークのブロード化が抑えられ、かつ速く溶出されたものと考えられる。

なお、カラムの接続順が逆の場合（つまり CRS の後に HSG を接続した場合）では不明なピークが数多く検出された（Fig. 10）。十分な機構は明らかでないが、陽イオン交換分離カラム内でイオン交換あるいはイオン排除作用により分離された試料イオンの一部が、陰イオン交換ガードカラムを通過するときにも再度分離されることで、ピーク割れを生じたものと予想される。

また、上記の陽イオン交換カラムと同じ固定相の陽イオン交換ガードカラム（TSKgel guardcolumn Super IC-CR : CRG, 4.6 mm i. d. × 10 mm, 粒子径 3 μm particle, 陽イオン交換容量 1.0 meq/L, 東ソー株式会社製）を、陰イオン交換ガードカラムの後ろに接続し、8 mM TA に 0.5 mM 18C6 を添加した溶離液を用いた場合も検討したが、陽イオンの保持が不十分となり陽イオンを完全に分離することができなかった（Fig. 11）。陰イオンは 1 cm の（第 4 級アンモニウム基）カラムでも分離可能だったが、これは酸性溶離液を用いているために、陽イオン交換基（第 4 級アンモニウム基）に対して競合する OH⁻が競合せず陰イオンが強く保持されやすくなるためである。

以上より、溶離液の種類によっては F⁻と H₂PO₄⁻の分離能や NO₃⁻のピーク形状を改善する必要があるが、従来のノンサプレッサー型 IC の陰イオン及び陽イオンの分析精度 と遜色ない結果を得ることができた。

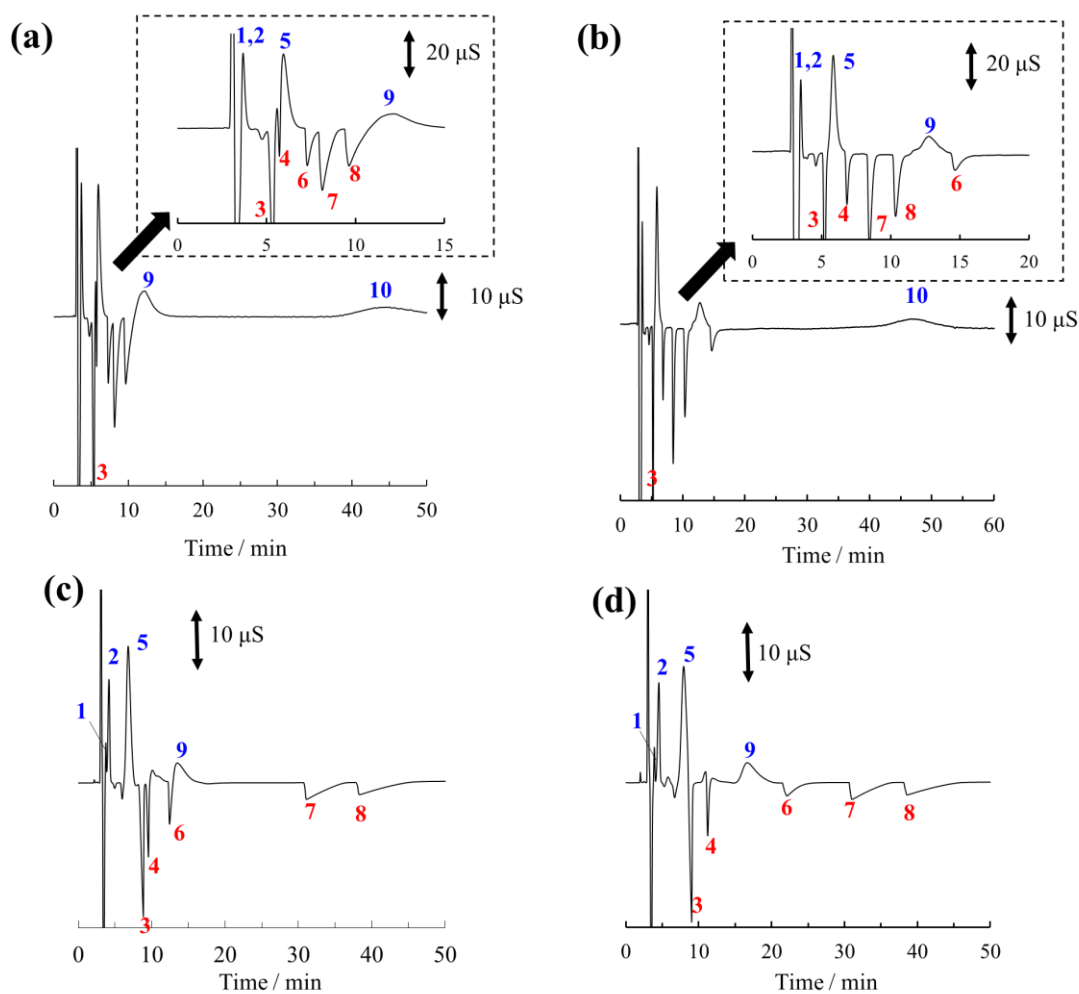


Fig. 9 Chromatogram of anions and cations separated by anion-exchange guard column (TSKgel guardcolumn SuperIC-A HS: HSG) and cation-exchange column (TSKgel Super IC-CR: CRS). Eluent: (a) 8 mM tartaric acid, (b) 8 mM tartaric acid plus 0.5 mM 18C6, (c) 4 mM malic acid and (d) 4 mM malic acid plus 0.5 mM 18C6. The upper-right portion in Figs. 7(a) and 7(b) are the enlargement of the chromatograms from 0 to 15 min. Flow rate: 0.6 mL/min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Peak identities: (1) F⁻, (2) H₂PO₄⁻, (3) Na⁺, (4) NH₄⁺, (5) Cl⁻, (6) K⁺, (7) Mg²⁺, (8) Ca²⁺, (9) NO₃⁻, and (10) SO₄²⁻. Other conditions are the same as in Fig. 3.

Table 3 Analytical performances of analyte ions obtained by the present simultaneous IC

Analyte	Approximate ^a	Correlation coefficient, r^2	RSD ^b , peak area, %	RSD ^b , retention time, %	LOD ^c , S/N=3 / μM	LOQ ^c / μM
Cl^-	$y = 1290x - 7.5$	0.9998	0.7	0.2	8.9	29.6
NO_3^-	$y = 710x - 32$	0.9990	4.71	0.98	10.3	34.0
SO_4^{2-}	$y = 1290x + 3.8$	0.9998	3.5	0.3	20.1	67.2
Na^+	$y = 426x + 0.68$	0.9999	0.4	0.2	0.8	2.5
NH_4^+	$y = 334x - 18$	0.9994	1.0	0.1	8.6	28.6
K^+	$y = 339x - 15$	0.9999	0.5	0.1	37.2	124.0
Mg^{2+}	$y = 782x + 8.2$	0.9999	0.5	0.1	1.5	5.1
Ca^{2+}	$y = 604x + 0.18$	0.9998	0.8	0.1	2.2	7.3

^a Concentration range of the injected analyte was from 0.05 mM to 1 mM.

^b RSD: relative standard deviation. The data were estimated from triplicate measurements.

^c The concentrations of analyte anion to estimate the LOD were 0.01 mM.

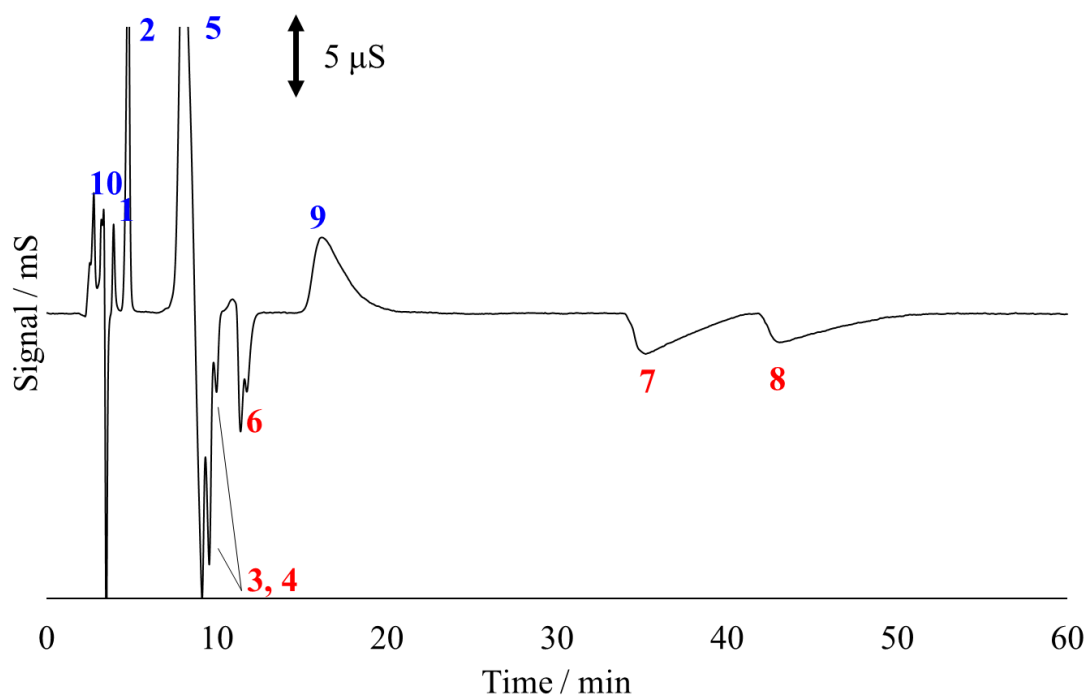


Fig. 10 Chromatogram of anions and cations separated by cation-exchange column (TSKgel Super IC-CR: CRS) and anion-exchange guard column (TSKgel guardcolumn SuperIC-A HS: HSG). Eluent: 8 mM tartaric acid. Flow rate: 0.6 mL/min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Peak identities: (1) F⁻, (2) H₂PO₄⁻, (3) Na⁺, (4) NH₄⁺, (5) Cl⁻, (6) K⁺, (7) Mg²⁺, (8) Ca²⁺, (9) NO₃⁻, and (10) SO₄²⁻. Other conditions are the same as in Fig. 3.

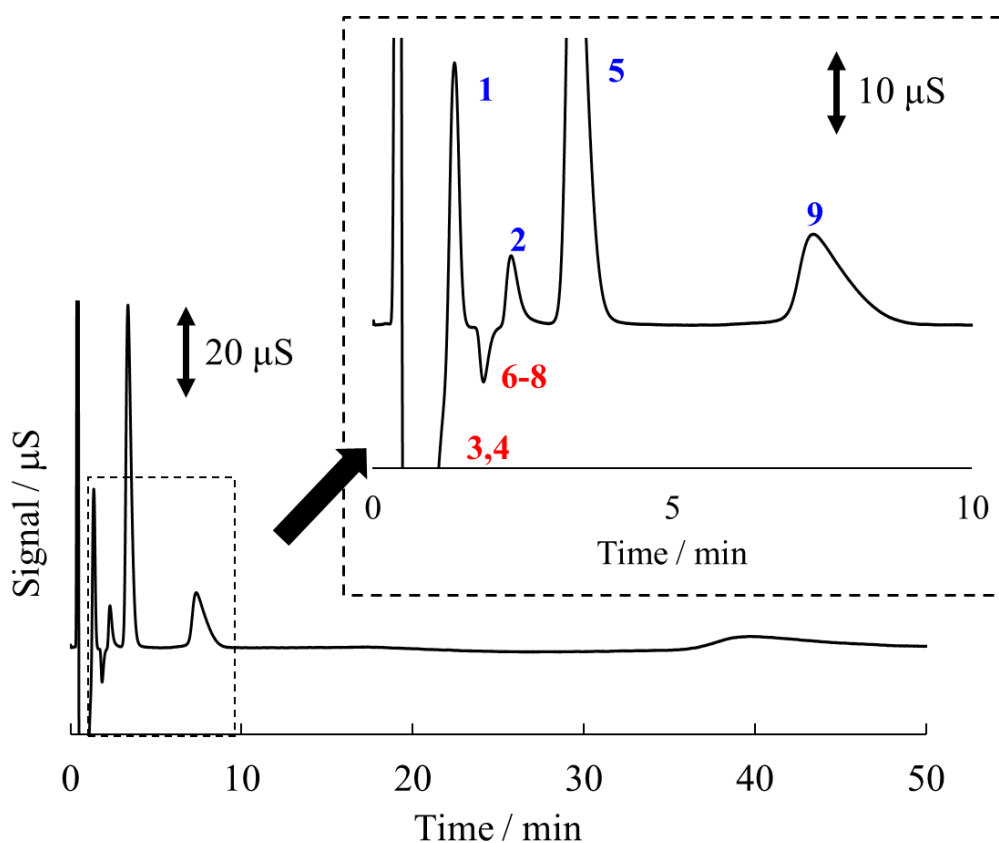


Fig. 11 Chromatograms of anions and cations separated by anion-exchange guard column (HSG) and cation-exchange guard column (TSKgel guardcolumn Super IC-CR: 4.6 mm ID \times 1 cm). Columns were connected in order of anion-exchange guard column and cation-exchange guard column in series. Eluent: 8 mM tartaric acid plus 0.5 mM 18C6. Flow rate: 0.6 mL/min. Injected sample: a mixture of NaF, NaNO₂, NH₄NO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ and CaCl₂ (1 mM for each). Peak identities: (1) F⁻, (2) H₂PO₄⁻, (3) Na⁺, (4) NH₄⁺, (5) Cl⁻, (6) K⁺, (7) Mg²⁺, (8) Ca²⁺, (9) NO₃⁻, and (10) SO₄²⁻. Other conditions are the same as in Fig. 3.

2. 4. 結論

本研究では、酸性溶離液による無機陰イオンの分離に 1 cm の AXG カラムを適用し、河川水試料中の無機陰イオンを定量することができた。更に、AXG と CXS を直列に接続し、溶離液に 8 mM 酒石酸を用いることで、50 分以内に 8 種の無機イオンを分離することが可能だったことから、電荷の異なる複数の無機イオンを低カラム圧・一つの測定条件にて分析できる、操作性の高い水質モニタリング技術を開発することができたとと言える。

本章の実験を経て、同時分離法における強酸性の 1 価陰イオンと 1 価及び 2 価陽イオンの分離能改善は達成することができたが、1 価弱酸イオンの分離能改善と SO_4^{2-} の保持時間の短縮が課題となった。イオン交換作用を用いた無機イオンの分離では、特にフッ化物イオンが溶離液ディップや直後に来る弱酸イオンと保持時間が重なる傾向にあり、これが 1 価弱酸陰イオンの分離能を低減させていた。そこで、これまで IC のカラムとして用いられることのなかった固定相のうち、F⁻ に対し配位子交換作用を示すものに着目し、イオン交換基との静電的吸着により保持される 1 価弱酸陰イオンとの分離を図る必要があると考えた。

第 3 章・第 4 章では、環境水中に主に含まれる無機陰イオンの分離能改善に焦点を置き、上記の観点からシリカゲル固定相とジルコニア固定相の無機陰イオンに対する分離選択性について検討することとした。次章ではシリカゲル固定相を用いて無機陰イオンの分離を行った結果を報告する。

2. 5. 参考文献

- [1] K.R. Elkin, *J. Chromatogr. A*, **1352**, 38-45 (2014)
- [2] 吉田奈央, 2015 年度群馬大学工学部応用化学科卒業研究論文, pp. 3-8 (2016).
- [3] J.S. Fritz and D. T. Gjerde, "Ion Chromatography-4th edition", Wiley VCH, Weinheim, Chapter 5, pp. 87-88 (2007)
- [4] N. Nakatani, D. Kozaki, M. Mori, K. Hasebe, N. Nakagoshi, and K. Tanaka, *Anal. Sci.*, **27**, 499-504 (2011)
- [5] M. Mori, K. Tanaka, M. I. H. Helaleh, Q. Xu, M. Ikedo, Y. Ogura, S. Sato, W. Hu, K. Hasebe, and P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **997**, 219-224 (2003)
- [6] S. M. Kwon, K. P. Lee, K. Tanaka, and K. Ohta, *J. Chromatogr. A*, **850**, 79-84 (1999)
- [7] C. Johns, R. A. Shellie, C. A. Pohl, and P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6931-6937

(2009).

[8] D. Connolly, D. Victory, and B. Paull, *J. Sep. Sci.*, **27**, 912-920 (2004)

第 3 章 酸性溶離液を用いるジオール修飾シリカゲル固定相による無機陰イオン分離

3.1. 緒言

これまでの IC は、イオン交換基を有するカラムを用い、イオン交換作用あるいはイオン排除/浸透作用によってイオンを分離するのが一般的だったが、シリカゲル上に中性の親水ポリマーや電気的中性の両性イオン化合物を配位子した固定相でもイオンの分離が可能であることが数多く報告されている [1-8]。これらの固定相では、溶離液中の試料イオンと固定相とのイオン-双極子相互作用や錯形成等によって試料イオンを分離すると考えられている [9]。イオン交換作用以外での分離機構によってイオンを分離できるということは、イオン交換樹脂を用いるこれまでのイオン交換型 IC では限界だった弱酸性陰イオン (NO_2^- や F^- 等) の分離能改善や、固定相と親和性のあるイオンをターゲットにした選択的分離定量法の開発につながる。

また、IC によるイオンの保持挙動は官能基を支える基材の種類にも影響する。IC カラムの基材の多くはポリスチレンやポリメタクリレート等のポリマーが多い [10]。これは、最も普及しているサプレッサー付導電率検出 IC での陰イオンの分離において用いられている溶離液が主に水酸化カリウムや炭酸ナトリウム等の塩基性溶液であるため、塩基に溶解する多孔質シリカは陰イオンの分離に不適であるためである。一方、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の固定相には多孔質シリカを用いることが多い [11, 12]。これは、多孔質シリカが移動相で用いられる様々な有機溶媒に耐性を有するからである。また、未修飾のシリカゲルでも酸性溶離液で金属陽イオンを分離できること [13] も知られており、イオン交換樹脂を固定相としたカラム (20 万円弱) よりも製造工程が少ないために安価 (10 万円前後) に入手できるシリカゲルは、溶離液 pH に制限があることを除けば魅力的な固定相の一つである。

更に近年の IC に関する研究では、食品及び薬品管理や電子基板の洗浄液等に含まれる極微量イオンの高精度測定が要求されているため、質量分析計やコロナ荷電化粒子検出器のような高感度検出器が多数使用されている。これらの高感度検出器の多くでは検出部直前に試料及び移動相 (IC では溶離液) をスプレー状にするため、揮発しやすい有機溶媒 (メタノール, アセトニトリル等), 弱酸性の塩 (ギ酸アンモニウム, 酢酸アンモニウム等) あるいはそれらの混合溶液を移動相に用いることが多い。したがって、こ

のような場合においても薬品耐性の高い多孔質シリカ基材の固定相の需要は高い。

既報 [14, 15] では、上述の観点でシリカゲル基材の HPLC カラムを用いて陰イオンの分離を試みている。その結果、分子内に第 4 級アンモニウム基とスルホン酸基の両方を有するスルホベタイン基シリカや 1,3-プロパンジオールをシリル化剤で固定したジオール基修飾シリカ等を充填したカラムを用い、弱酸性脂肪族カルボン酸の酒石酸やフタル酸を溶離液として用いることによって陰イオンが分離できることが分かっている。これは、陰イオンの保持が酸性条件におけるジオール基のプロトン化が影響しているものと推察したが、分析対象試料が 1 価の陰イオンに限られ、弱酸性陰イオン（フッ化物イオン、亜硝酸イオン）と 2 価の硫酸イオンの保持挙動、カラム温度の影響等については詳細に検討されていなかった。1 価弱酸イオンを含む陰イオンの分離を酸性溶離液条件で行うことができれば、高理論段の分離を与える多孔質シリカゲルを IC のカラム基材として利用でき、種々な測定機器に柔軟に対応できる。

そこで本研究では、イオン交換基を有しない固定相における IC 研究の一環としてジオール基修飾シリカゲルカラムを用い、酸性溶離液の種類や濃度およびカラム温度を変化させたときの陰イオンの保持挙動を観察した。これにより第 2 章で課題となった 1 価弱酸陰イオンと硫酸イオンの分離能改善を図った。

3.2. 実験

3.2.1. 試薬

溶離液と標準試薬は、和光純薬工業製の特級試薬を使用した。検量線作成に使用した標準試薬は、フッ化ナトリウム (NaF)，亜硝酸ナトリウム (NaNO₂)，硝酸アンモニウム (NH₄NO₃)，リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄)，硫酸マグネシウム (MgSO₄) および塩化カルシウム (CaCl₂) であり、ストック溶液はすべて 0.1 M に調製した。試薬の溶解、溶離液の調製及びストック溶液の希釈は、ミリポア社製 WEX3 純水製造装置、またはエルガ社製 Pure Lab flex3 によって得られた純水を用いた。

3.2.2. 実験条件

本実験で用いたイオンクロマトグラフは送液ポンプ、サンプルインジェクター、カラムオープン、導電率検出器を搭載した東ソー製 IC 2001 を、カラムは東ソー製 TSKgel OH-120 (以下 OH-120. 150 mm × 4.6 mm i.d.; 粒径 5 μm. 非売品) を用いた。カラムは測定の前に溶離液により 1 時間程度平衡化した。溶離液は酒石酸とリンゴ酸を用いた。

これらの溶離液は第2章にて使用したものであるが、既報 [15] でもこの溶離液で市販のジオールシリカゲルカラム Acclaim™ HILIC10 (以下, HILIC10. 150 mm×3.0 mm, i.d., Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) において良好な 1 価陰イオンの分離が得られている。溶離液流速は 0.6 mL min^{-1} に統一し、カラム温度は $40\sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$ まで変化させた。カラム温度の変化はアズビル株式会社製 SDC 温度調節器付カラムオープン (試作機) を用いた。陰イオンの検出は導電率検出器 (ノンサプレッサー) を用いた。注入した標準試料は, NaF, NaNO_2 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 および CaCl_2 の混合試料溶液を用い、試料濃度はそれぞれ 1 mM に調製した。試料注入量は $30 \mu\text{L}$ とした。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 溶離濃度の影響

はじめに, OH-120 における陰イオンの保持挙動を評価するため, 溶離液である酒石酸及びリンゴ酸の濃度変化に伴う陰イオンの保持容量の変化を調べた。

酒石酸溶離液では, Fig. 1a に示されるように, 分析対象の 6 種類の陰イオン (フッ化物イオン: F^- , 塩化物イオン: Cl^- , リン酸イオン: H_2PO_4^- , 亜硝酸イオン: NO_2^- , 硝酸イオン: NO_3^- , 硫酸イオン: SO_4^{2-}) のすべてを 80 分以内に検出することができた。特に 6 mM では, SO_4^{2-} を含めた全体の保持時間は 50 分となり, 2.3.2. の Fig. 8 に示したクロマトグラムと比較して 10 分程度短縮することができた上, 1 価弱酸イオンの F^- , H_2PO_4^- , NO_2^- を分離することができた。溶出順は, 速い方から NO_2^- , H_2PO_4^- , Cl^- , NO_3^- , F^- , SO_4^{2-} となった。 F^- を除く陰イオンの溶出順は, 従来の IC に用いられる強塩基性陰イオン交換基カラムと炭酸溶離液で分離された結果 [16] と同様であり, 電荷数が大きく, 極性が低く, イオンサイズが大きい陰イオンが強く保持される傾向を示したため, イオン交換作用により分離されていると考えられる。ただし F^- は固定相に対して強く吸着されたためにピークがブロードし, 分離定量には至らなかった。先行研究 [15] でも, 類似した固定相が充填された HILIC10 を用い, 酒石酸溶離液において陰イオンの分離を試みているが, F^- 及び SO_4^{2-} の溶出は見られなかった。これは, 同じ種類の固定相でもシリカゲルの加工方法やシリカゲル上に修飾されたジオール基の種類が陰イオンの保持挙動に大きな影響を及ぼしているためと推察する。

一方, 酒石酸よりも酸解離定数 (pK_a) が高いリンゴ酸を溶離液に用いたときの分離を Fig. 1b に示す。溶出力が酒石酸よりも弱いリンゴ酸を用いることで陰イオンの保持

時間は長期化し 2 価の SO_4^{2-} を溶出することはできなかったが、特に NO_2^- の分離能が改善された。ただし F の保持時間は非常に不安定 (保持時間の相対標準偏差 (RSD) > 5%, $n=3$) だったことから、酒石酸の場合と同様、リンゴ酸の場合でも F が固定相に対してイオン交換作用ではなく、より強い吸着作用によって保持されていると考えられる。

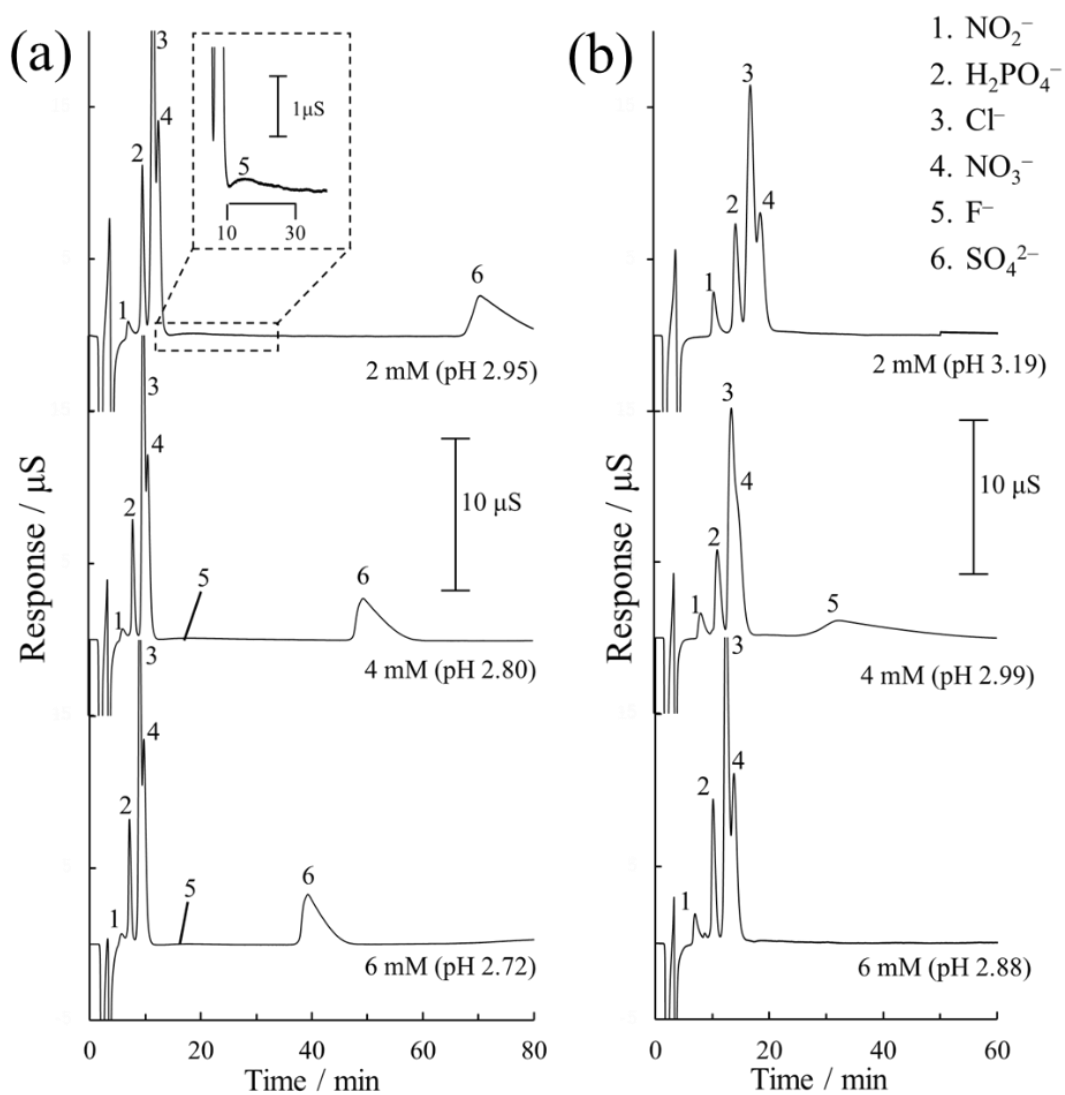


Fig. 1 Ion chromatograms of anions on (a) tartaric acid and (b) malic acid as eluent. Column: TSKgel OH-120 (150 mm \times 4.6 mm i.d). Flow rate: 0.6 mL min^{-1} . Column temp.: 40 $^\circ\text{C}$. Injection volume: 30 μL . Detection: conductivity (non-suppressor).

次に、試料陰イオンの固定相への吸着がイオン交換作用によるものかどうかを確認するために、Fig. 1 で示されたクロマトグラムから得られた保持時間を用いて式 (1) から保持係数 (k') を求めた。更に、保持係数と溶離液の酸濃度を常用対数でプロットし、最小二乗法により求めた近似式の傾きから陰イオンの保持に及ぼす酸濃度の種類と濃度の影響を考察した。

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1)$$

ここで、 t_0 は固定相に全く保持されない成分の保持時間であり、今回はナトリウムイオン (Na^+) の保持時間を t_0 として k' を算出した。

Fig. 2 に示されるように、試料陰イオンは溶離液の種類ではなく溶離液中の酸濃度に依存して減少する傾向を示した。特に酒石酸溶離液で得られた SO_4^{2-} の保持係数の減少は、2 価イオンであることから、その傾きは 1 価陰イオンの約 2 倍となった。一方 F の保持は、酒石酸のみの解析になるが、他の陰イオンと比べると酸濃度の増加に伴う保持容量の減少はわずかであった。

近似式の傾きを比べると、リンゴ酸を溶離液に用いたときの方が酒石酸よりも 1 価陰イオンに対して高い濃度依存性を示した。また、近似式の傾きは、酒石酸溶離液では $\text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- \cong \text{NO}_3^-$ 、リンゴ酸溶離液では $\text{NO}_2^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- \cong \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ となった。

水酸化物型陰イオン交換基上に配位した OH^- と溶質である 1 価の試料陰イオンがイオン交換したと仮定すると、Fig. 2 における近似式の傾きは理論的に 1 を示すはずである。しかし Fig. 2 の結果ではいずれも明らかに 1 よりも小さい傾きを示した。これより、陰イオンの分離においてジオールシリカとの相互作用は陰イオン交換作用だけでなく、溶離イオンとのイオン-双極子相互作用や、イオン (塩基) と固定相 (酸) との錯形成も発現していると考えられる [5, 6, 12]。なお、シリカゲルに官能基を修飾する場合、アミノ基を含むスペーサーを用いることもあり、これが酸性溶離液条件下でイオン結合することもある。更に F に対しては、ルイス酸塩基反応に基づいたシリカゲルへの強い親和性 [17] がピークのブロード化を生じさせたものと考えられる。

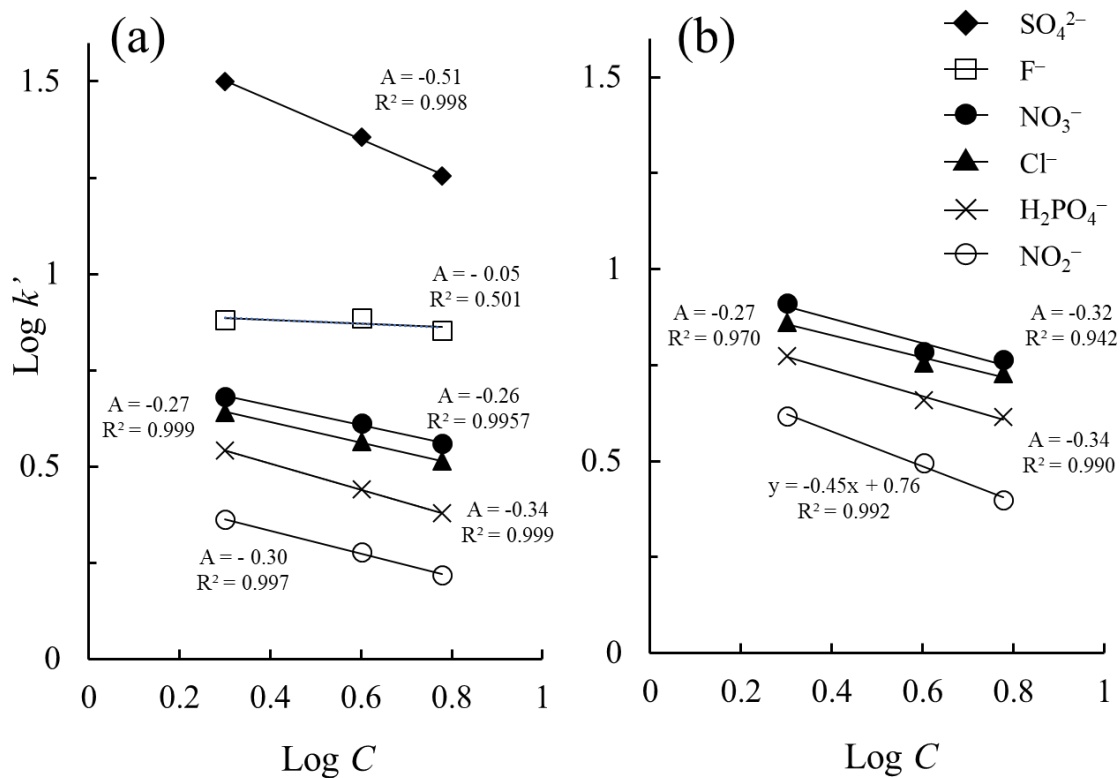


Fig. 2 The log plots of retention capacity (k') and acid concentration in eluent (C). Eluent: (a) tartaric acid, and (b) malic acid. A in the plot indicates slope in the approximate expression, and R^2 indicates the correlation coefficient. Other conditions are same as in Fig. 1.

3.3.2. 溶離液陽イオンの影響

次に溶離液陽イオンの影響を調べるため、溶離液を 6 mM リンゴ酸 (pH 2.88) とリンゴ酸ナトリウム (pH 7.45) としたとき、それぞれで得られたクロマトグラムを比較した。Fig. 3 に示されるように、溶離液がリンゴ酸ナトリウムするとき (つまり溶離液陽イオンが Na^+ のとき) に試料陰イオンの分離能が大きく減少した。この結果は、Arai et al. [15] が報告した酒石酸と酒石酸アンモニウムを用いた溶離液陽イオン (H^+ と NH_4^+) の影響を検討した結果と共通している。これにより、ジオールシリカ上に保持された溶離液中の水素イオン (H^+) が試料陰イオンの保持に関与している可能性が考えられる。

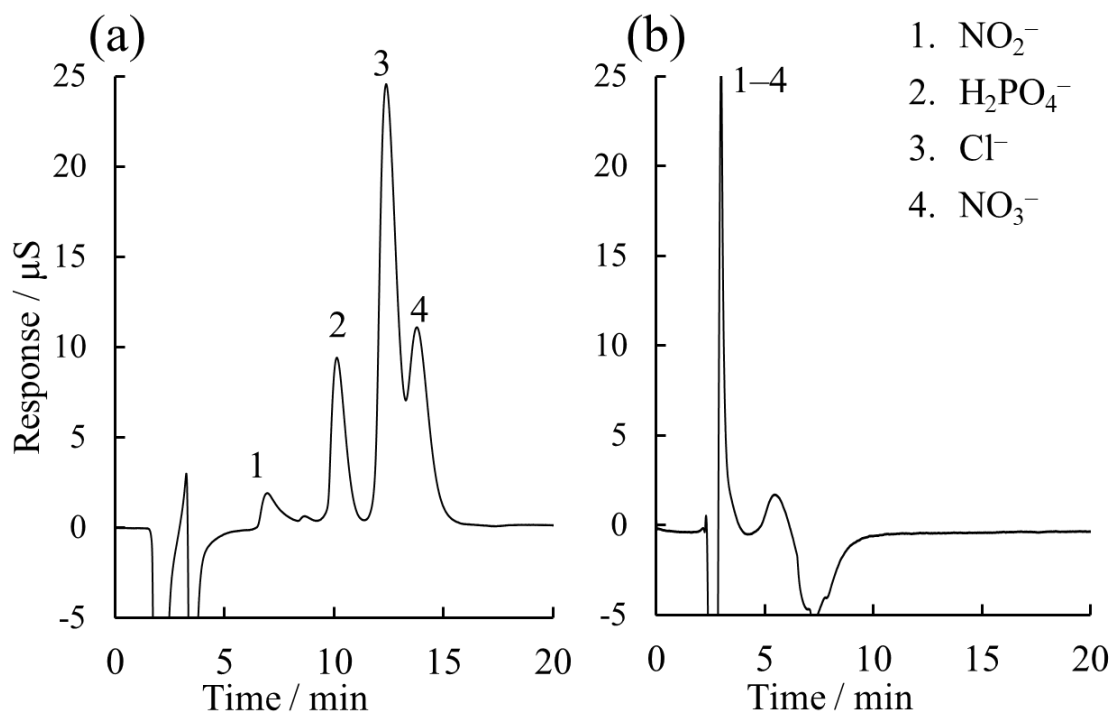


Fig. 3 Chromatograms of anions by (a) 6 mM malic acid (pH 2.88) and (b) 6 mM sodium malate (pH 7.45). Column temperature: 40 °C. Other conditions are same as in Fig. 1.

3.3.3. 予測される陰イオンの分離機構

3.3.1.および3.3.2.の結果を受け,予想される陰イオンの分離機構をまとめたものをFig. 4に示す. まず酸性溶離液条件下(ここではpH 2.72 ~ pH 3.19)ではシリカゲル上のジオール基(ここでは1,2-ブタンジオール)および残存シラノール基に H^+ が吸着し,プロトン化され分極状態となっていると考えられ [15,18,19],正電荷を帯び,そこに試料陰イオンが保持されていると考えられる.一方Fは,残存シラノール基のケイ素との配位子交換作用 [17]によって強く保持されるものと推察できる.Fの固定相に対する強い吸着によって, $H_2PO_4^-$ や NO_2^- といった1価弱酸イオンの分離が可能となっているが,Fの分離定量を可能とするにはピークのプロード化を改善する必要がある.

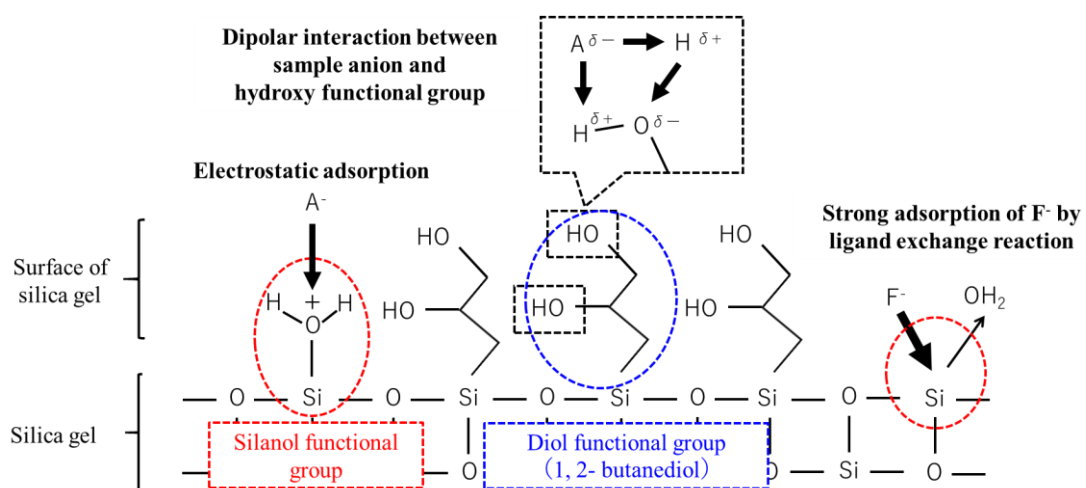


Fig. 4 Separation mechanism of inorganic anions in diol-silica gel column under acidic eluent.

3.3.4. カラム温度の影響

IC の分離能を制御する手段の一つにカラム温度を変化させる方法がある。シリカゲルカラムでもカラム温度により陰イオンの全体の保持時間をコントロールできると予想し、本研究ではカラム温度を 40~80 °C の範囲で変化させたときの陰イオンの保持挙動の変化を調べた。溶離液は、本研究で用いているジオールシリカにて SO_4^{2-} の溶出が認められた 4 mM 酒石酸を用いた。その結果、Fig. 5 に示されるように、1 価陰イオンはカラム温度に対する依存性は示さなかったのに対し、2 価陰イオンの SO_4^{2-} は 40 °C から 80 °C にかけて直線的に 10 分以上減少することが分かり、第 2 章で課題となっていた全体の保持時間を短縮できる可能性を見出した。

更に、陰イオンの保持係数とカラム温度との関係を、van't Hoff 式 (2) を用いて調べた [20]。

$$\ln k' = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \varphi \quad (2)$$

ここで、 k' は保持係数、 T はカラム温度、 ΔH 及び ΔS は、それぞれ移動相から固定相への物質移動に関するエンタルピー変化及び移動相から固定相への物質移動に関するエントロピー変化、 R は気体定数 (8.31 J/K mol)、 φ は固定相と移動相の相比 (= 0.40) を示す。これより得られた van't Hoff プロットを Fig. 6 に、最小二乗法から得られた近似式を式 (2) に換算して求めたエンタルピー (ΔH) とエントロピー (ΔS) を Table 1 に示す。 NO_2^- を除く他の陰イオンの ΔH は負に増大していることから、移動相から固定相への陰イオンの移動は発熱反応と予想される。特に SO_4^{2-} は溶離液への分散速度の温度依存性が大きく、温度上昇に伴って移動相への分散速度が速くなり、結果的に全体の保持時間が短くなったと考えられる。

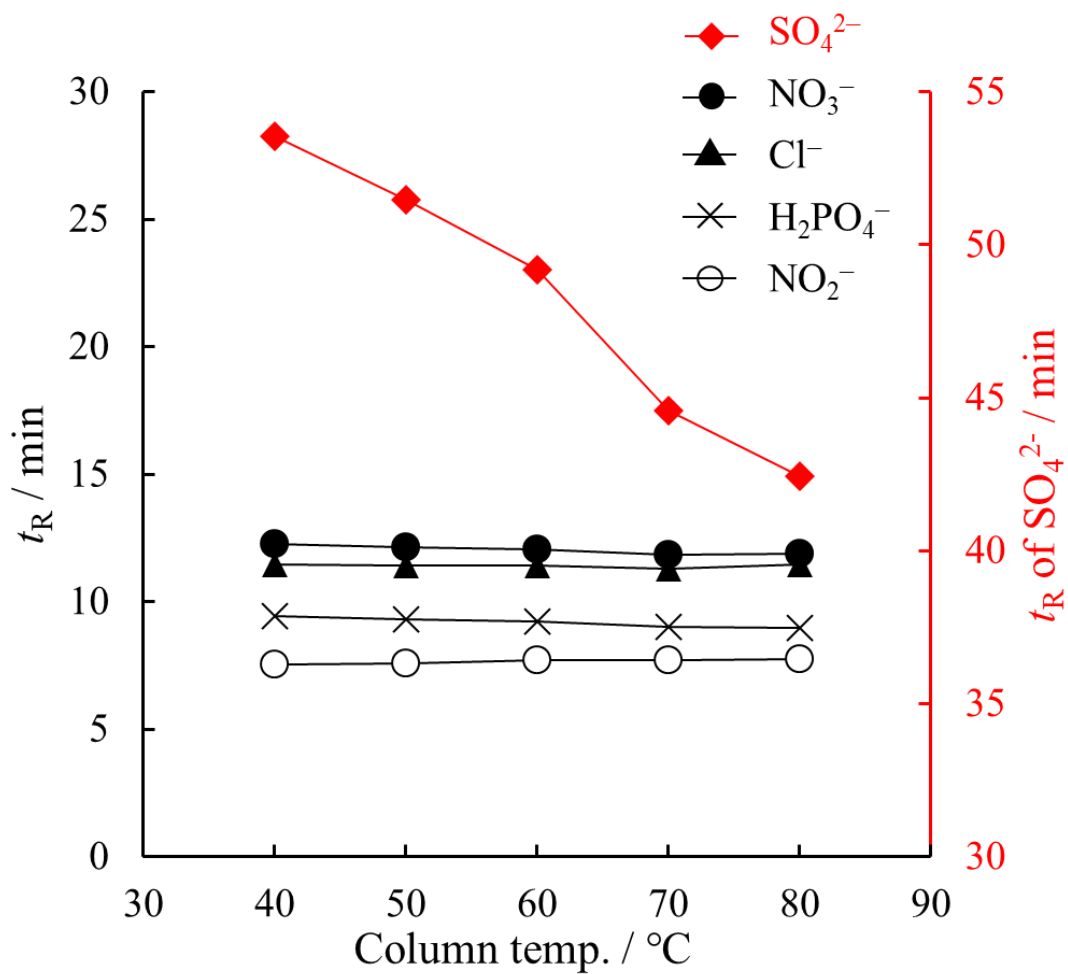


Fig. 5 Changes in the retention time (t_R) of several anions with increase of column temperature from 40 °C to 80 °C. Eluent: 4 mL tartalic acid. Flow rate: 0.6 mL min⁻¹. Other conditions are same as in Fig. 1.

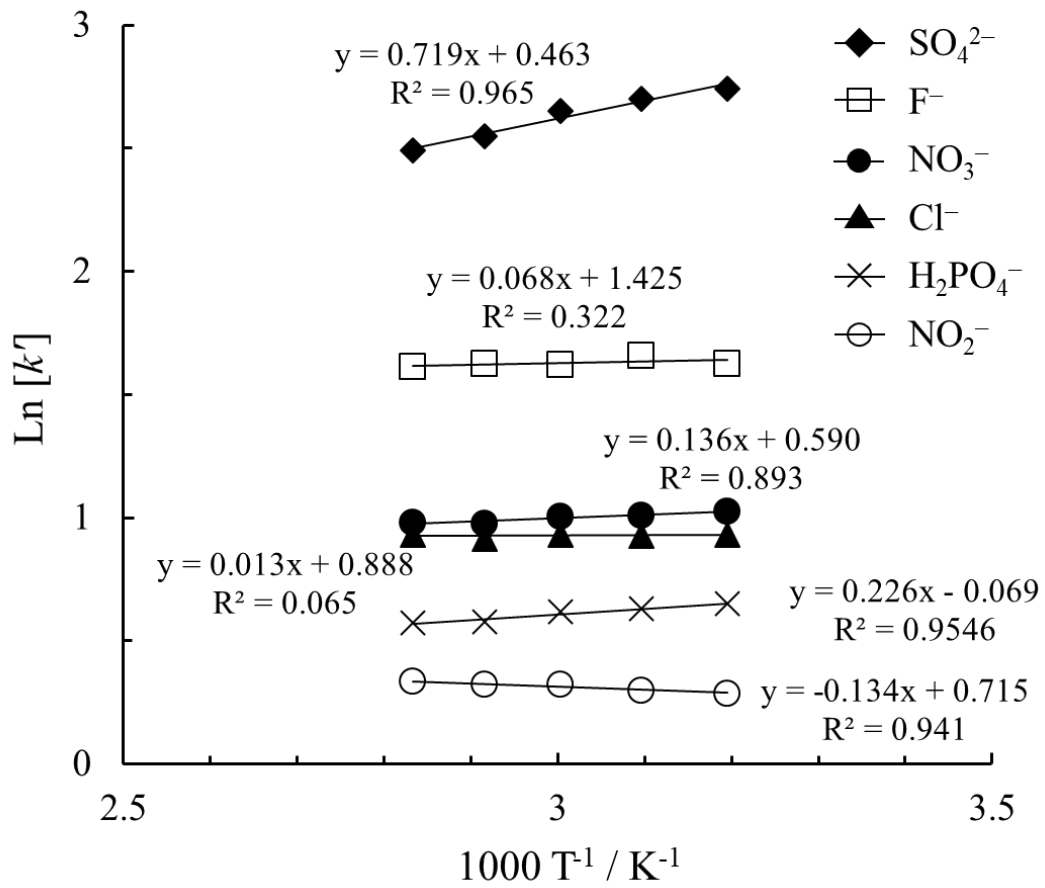


Fig. 6 Van't Hoff plots of anions

Table 1 Enthalpy and entropy of analyte anions to column temperature

Analyte	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
Nitrite (NO ₂ ⁻)	1.11	13.6
Phosphate (H ₂ PO ₄ ⁻)	-1.89	7.04
Chloride (Cl ⁻)	-0.11	15.0
Nitrate (NO ₃ ⁻)	-1.13	12.5
Fluoride (F ⁻)	-0.57	19.5
Sulfate (SO ₄ ²⁻)	-5.97	11.5

ただし、 NO_2^- はカラム温度の上昇に伴って保持時間が増加し、かつ3回繰り返し測定における保持時間及びピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が高くなっていた。4 mM 酒石酸においてカラム温度 40 °C の条件では保持時間の RSD は 2%、ピーク面積の RSD は 5%だったのに対し、80 °C の場合は保持時間の RSD は 7%、ピーク面積の RSD が 16% だった。そこで、 NaNO_2 標準試料を単独で注入し、カラム温度を 100 °C まで上昇させたときの NO_2^- の溶出挙動の変化を調べた。

その結果、Fig. 7 に示されるように、カラム温度の上昇に伴って保持時間が徐々に遅れると共に、70 °C 以上になるとピーク形状が崩れ、100 °C になると NO_2^- とは別のピークが約 12 分に検出された。田中 [21] は溶離液に超純水を用いたイオン排除型 IC にて、分離カラム内の水素型陽イオン交換基によって NO_2^- が NO_3^- に酸化されたことを報告している。実際に、カラム温度 100 °C で NO_3^- を分析したとき、同じカラム温度で NO_2^- を分析したときに約 12 分ごろに見られたものと同様のピークが検出された。したがって、カラム温度上昇に伴う NO_2^- の溶出時間の変化は、酸溶離液と共にカラム内を移動しているときに生じる酸化が影響したものと考えられる。

以上から、OH-120 でもカラム温度を操作することで陰イオン全体の保持時間を短縮させることはできるが、 NO_2^- は NO_3^- に酸化されてしまうため正確に定量できない可能性があることが分かった。

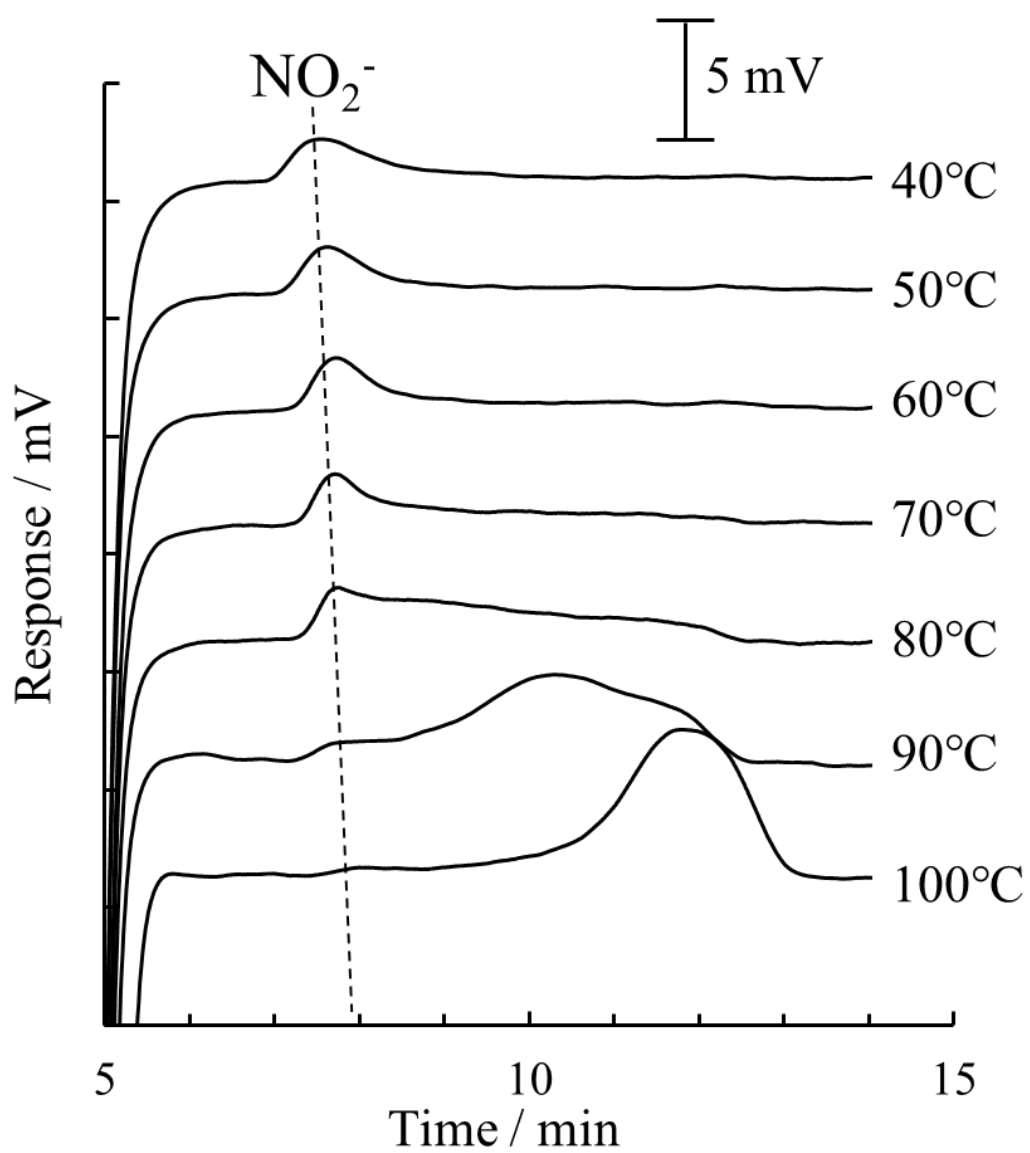


Fig. 7 Changes in the retention time of nitrite ion depending on the column temperature from 40 °C to 100 °C. Eluent: 4 mM tartaric acid. Other conditions are same as in Fig. 1.

3. 4. 結言

本研究では、イオン交換機能を持たないジオール基を修飾したシリカゲルカラム OH-120 に酸性溶離液（酒石酸，リンゴ酸）を用いて陰イオンの分離を行い，陰イオンの分離メカニズムを明らかにした．酸性溶離液を用いることで固定相上のジオール基および残存シラノール基が正電荷を帯び，これに対して陰イオンが静電的に保持される一方，Fはシリカゲル固定相表面のケイ素原子に対して静電的作用よりも強い吸着作用である配位子交換作用により吸着されていると考えられた．6 mM TA で 1 価の弱酸陰イオンの分離能改善と全体の保持時間の短縮を実現することができたが，シリカゲル固定相は F に対する吸着能が強すぎピークが大きくブロードするため，F の分離定量には向かないことが分かった．

また，OH-120 においてもイオン交換樹脂を固定相としたカラムと同様，カラム温度の制御が効率的な分析に有効だが，NO₂は温度上昇に伴い NO₃に酸化されるため，高温条件では NO₂を正確に定量できないことが分かった．

そこで，これまで IC ではほとんど用いられることのなかったジルコニアも F に対し強い親和性があることに着目し，次章ではジルコニアを固定相としたカラムによる F の選択的分離を中心に無機陰イオンの保持挙動を調べた結果を述べる．

3. 5. 参考文献

- [1] W. Hu, T. Takeuchi, and H. Haraguchi, *Anal. Chem.*, **65** (17), 2204-2208 (1993).
- [2] W. Hu, *Langmuir*, **15** (21), 7168-7171 (1999).
- [3] H. A. Cook, W. Hu, J. S. Fritz, and P. R. Haddad, *Anal. Chem.*, **73** (13), 3022-3027 (2001).
- [4] W. Hu, P. R. Haddad, K. Tanaka, and K. Hasebe, *Anal. Bioanal. Chem.*, **375** (2), 259-263 (2003).
- [5] M. Igawa, K. Saito, J. Tsukamoto, and M. Tanaka, *Anal. Chem.*, **53** (12), 1942-1944 (1981).
- [6] T. Takeuchi, and L. W. Lim, *Anal. Sci.*, **26** (9), 937-941 (2010).
- [7] T. Takeuchi, and L. W. Lim, *Anal. Sci.*, **27** (10), 1019-1023 (2011).
- [8] L. W. Lim, L. Rong, and T. Takeuchi, *Anal. Sci.*, **28** (3), 205-213 (2012).
- [9] 岡田哲男，山本敦，井上嘉則，クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析，株式会社エヌ・ティー・エス，東京都，pp. 46-50 (2002).
- [10] A.V. Zatirakha, A.D. Smolenkov, and O.A. Shpigun, *Anal. Chim. Acta*, **904**, 33-50 (2016).
- [11] J. Li, H-F. Zhang, and Y-P. Shi, *Anal. Sci.*, **27** (4), 447-451 (2011).
- [12] T. L. Chester, *Anal. Chem.*, **85** (2), 579-589 (2013).

- [13] K. Ohta, M. Sando, K. Tanaka, and P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **752** (1-2), 167-172 (1996).
- [14] K. Arai, M. Mori, T. Hironaga, H. Itabashi, and K. Tanaka, *Chin. J. Chromatogr.*, **30**, 404-408 (2012).
- [15] K. Arai, M. Mori, D. Kozaki, N. Nakatani, H. Itabashi, and K. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **1270**, 147-152 (2012).
- [16] イオンクロマトグラフィー研究懇談会委員, 役に立つイオンクロマト分析, みみずく舎, 東京, p. 46 (2009).
- [17] J. M. Roberts, *Anal. Chem.*, **74** (19), 4927-4932 (2002).
- [18] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, **779**, 29-71 (1997).
- [19] D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 3408-3417 (2010).
- [20] T. Galaon, and V. David, *J. Sep. Sci.*, **34** (12), 1423-1428 (2011).
- [21] K. Tanaka, *Bunseki Kagaku* (Japanese), **30** (10), 661-666 (1981).

第 4 章 ジルコニア固定相を用いたイオンクロマトグラフィーによる無機陰イオンの分離に関する研究

4.1. 緒言

液体クロマトグラフ法で用いられるカラムの固定相には、第 2 章で用いたイオン交換樹脂や第 3 章で用いたシリカゲルの他に、高極性物質の金属酸化物であるチタニア、アルミナ、ジルコニアがある。これらの固定相は有機溶媒の移動相と組合わせた順相クロマトグラフィー (Normal phase liquid chromatography: NLC) で頻繁に使用されている [1-3]。最近では、これらの固定相に有機溶媒と水を混合した移動相を流し、固定相の表面に形成されるごく薄い水の相に溶質を分配させ分離分析する親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography : HILIC) での固定相に用いられている [4, 5]。

特に、ジルコニアはチタニアやアルミナと比較して結合強度が高くシリカと同等であり、これがジルコニアの物理的強度を生み出している [4]。ジルコニアは単斜晶，正方晶，立方晶の複数の結晶構造を持ち，特に単斜晶で優れた物理的強度を持つ [6]。溶解液 pH 範囲が酸性～中性域に制限されるシリカゲル，チタニア，アルミナに対し，ジルコニアは幅広い pH 範囲に対応可能であり，かつ有機溶媒に対する耐性も高い。また，ジルコニアの化学的特性として，粒子表面のヒドロキシ基が溶液の pH によって正電荷と負電荷の両方を帯電するため，陰イオン交換体にも陽イオン交換体にもなりうる [6, 7] (Fig. 1)。



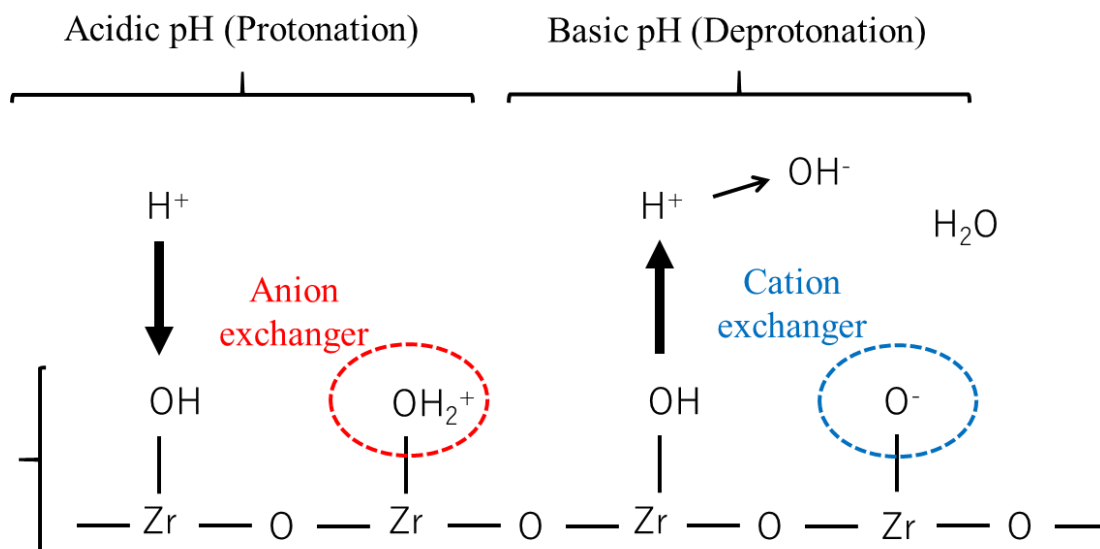


Fig. 1 Mechanism of chemical reaction in the hydroxy groups orientated on zirconia surface.

本章ではこのようなジルコニアの物理的・化学的特性に着目した。ジルコニアを固定相とした IC の先行研究では、金井 [8] が pH 8.5-11 の炭酸溶離液を用い、未修飾ジルコニアが充填された ZirChrom 社製カラム ZirChrom®-PHAZE (50 mm × 4.6 mm i.d.; 粒径 3 μm) およびジルコニア担体塩基性陰イオン交換カラム ZirChrom®-SAX (粒径 3 μm, 150 mm × 4.6 mm i.d.) による陰イオンの保持挙動を検討しており、F⁻が配位子交換作用によって選択的に保持されることを結論づけている。また森ら [9] は、ジルコニア固定相に高い親和性を持つリン酸イオンおよび α-ヒドロキシ酸 (クエン酸, 酒石酸等) を修飾し陽イオン交換体を形成させ、2 価陽イオンの分離を試みている。しかし、イオン交換基を修飾したジルコニア固定相を IC の固定相として用いた例はこれまでになかった。

そこで本研究では、同時分離法における無機陰イオンの分離能を改善する新たな試みとして、ジルコニアに陰イオン交換基を修飾し、F⁻を含む陰イオンの保持挙動への変化を調べた。なお、ジルコニアカラムもシリカゲルカラムと同様、イオン交換樹脂を固定相としたカラムよりも製造工程が少ないため、イオン交換樹脂カラムよりも安価に入手できる。

4.2. 実験

4.2.1. 試薬

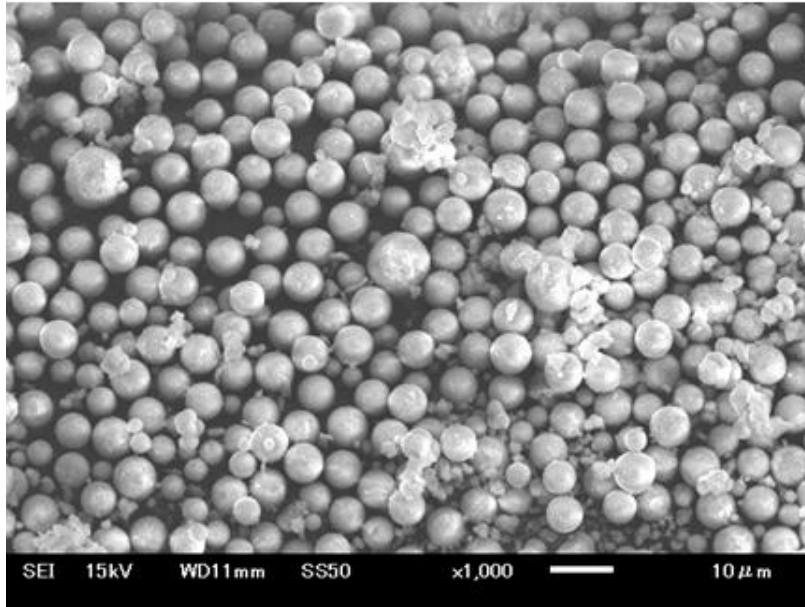
溶離液と標準試薬の調製には、和光純薬工業製の特級試薬を使用した。標準試薬はフッ化ナトリウム (NaF), ヨウ化カリウム (KI), 臭化ナトリウム (NaBr), 塩化ナトリウム (NaCl) で、ストック溶液はすべて 0.1 M に調製し、適宜希釈して使用した。溶離液には炭酸水素ナトリウム, 炭酸ナトリウム, フタル酸, フタル酸ナトリウム, の 4 種類の溶液を用いた。フタル酸ナトリウムの調製には、水酸化ナトリウムと塩化水素を用いた。試薬の溶解, 溶離液の調製及びストック溶液の希釈には、ミリポア社製 WEX3 純水製造装置により精製された純水を用いた。

4.2.2. ジルコニア

本章で用いたジルコニアは、本学大学院理工学府・岩本准教授から提供された、ソルボサーマル法 [8-10] にて 500 °C で焼成して得られた球状ジルコニア (BET 比表面積 : 111 m²/g, 細孔容積 : 0.16 cm³/g. 以下 ZrO₂ と表記する) である。Fig. 2 の SEM 画像から分かるように、ZrO₂ は非常に均一な球状を示しており、1 次粒子径は IC で用いられるシリカゲルやポリマーと同程度の 3~5 μm となっている。

ZrO₂ および DETA-ZrO₂ の充填は、Fig. 3 のようにバキューム（アズワン社製 DRY ASPIRATOR DAS-01）に PEEK 製エンブティカラム（ケミテス社製：50 mm×4.6 mm i.d.）を接続し、6.0～8.0 MPa で吸引しながら 1.7～1.9 g の範囲で充填した。充填は適宜純水を加え分散させながら少しずつ行った。

10 μm



5 μm

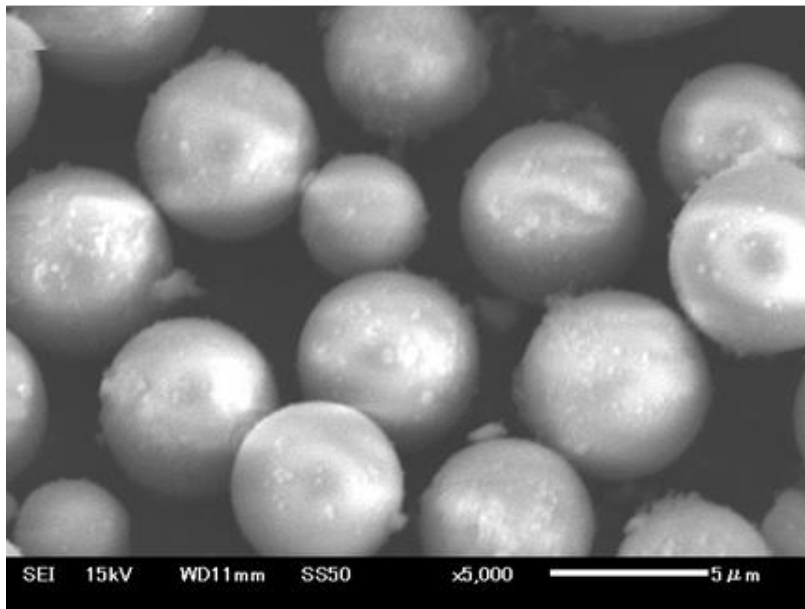


Fig. 2 SEM image of ZrO₂ sintered at 500 °C

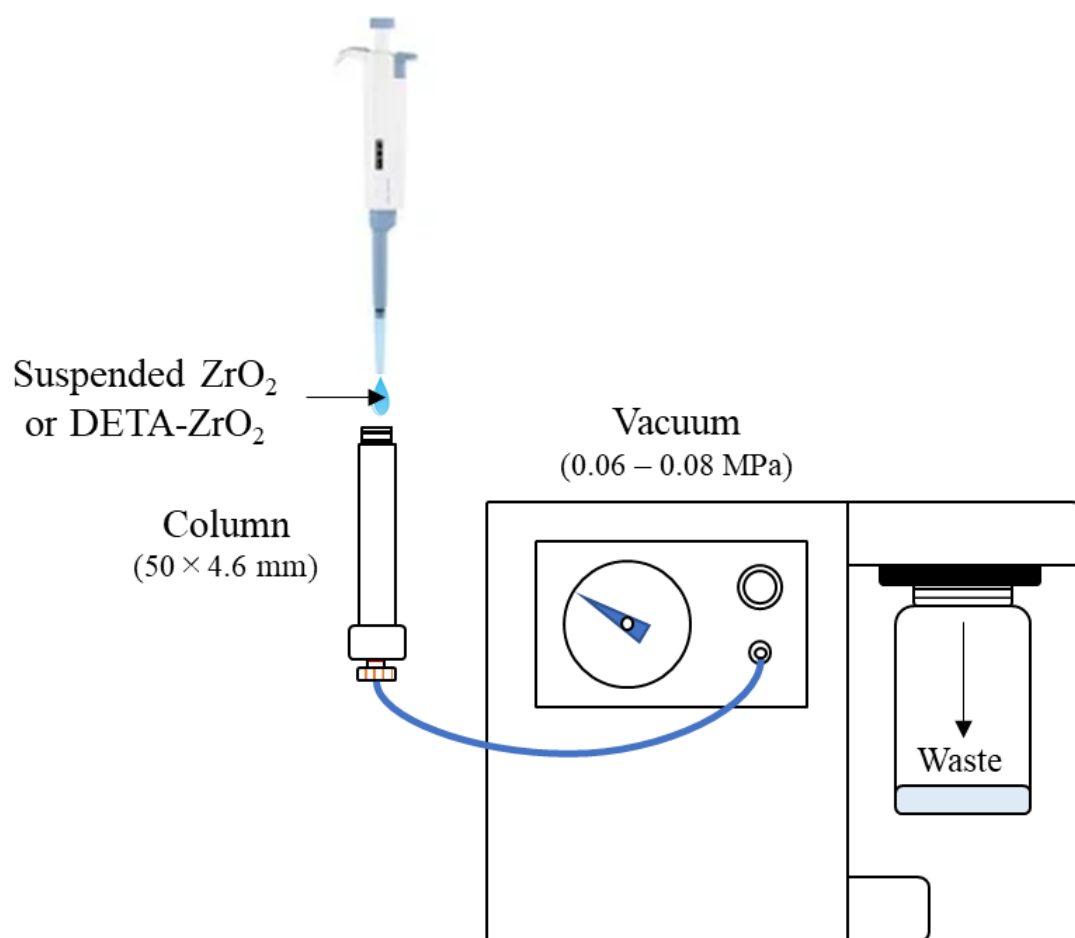


Fig. 3 Schematic illustration of column packing.

4.2.3. 陰イオン交換基修飾ジルコニアの作製

ZrO₂ への陰イオン交換基の修飾には、N'- (3-トリメトキシシリルプロピル)ジエチレントリアミン (DETA) を用い、次の手順にて弱塩基性陰イオン交換基であるアミノ基 (—NH₂) の修飾を行った。

まず酢酸 5 mL と DETA 10 mL を混合した溶液に未修飾の ZrO₂ 2.0g を添加し、60 °C で 24 時間連続攪拌し反応させた後、遠心分離機を用いて純水にて 3 回洗浄し、70 °C にて 24 時間乾燥させた。修飾回数は 1 回から 3 回までそれぞれ行い、アミノ基の修飾量の変化を比較した。ZrO₂ 上に修飾されたアミノ基の同定には、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR, サーマサイエンティフィック製 Nicolet iS50) を用いた。

4.2.4. 物性評価

溶液中の ZrO₂ とアミノ基 (DETA) 修飾ジルコニア (DETA-ZrO₂) の表面電位および二次粒子径の pH 依存性を調べるために、ゼータ電位測定装置 (Malvern 社製ゼータサイザーナノ ZS) を用いた。測定に際し、試料溶液として 10 mM の KCl 溶液 200 mL 中に 20 mg の ZrO₂ あるいは DETA-ZrO₂ を添加し、超音波分散を 10 分間行った後、0.1 M NaOH と 0.1 M HCl で溶液 pH を変化させながら測定した。

4.2.5. イオンクロマトグラフィー

本実験で使用したイオンクロマトグラフは、送液ポンプ、試料インジェクター、カラムオーブン、導電率検出器を内蔵した東ソー製 IC 2010 である。カラムは、球状 ZrO₂ を充填したカラム (ZrO₂ カラム : 50 mm × 4.6 mm i.d.) と DETA-ZrO₂ を充填したカラム (DETA-ZrO₂ カラム : 50 mm × 4.6 mm i.d.) の 2 本を作製し使用した。溶離液には炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸の 4 種類を用いた。ジルコニアは有機溶媒に対する強度も高いが、カラムフィルターが破損する可能性があったため、本章では有機溶媒を使用しなかった。カラムは分析前に溶離液を 1 時間程度通液し平衡化した。溶離液流速は 0.8 mL min⁻¹、カラム温度は 40 °C、試料注入量は 30 μL に統一した。検出には導電率検出器を使用した。溶離液の種類に応じて、適宜サプレッサーモードにて測定を行った。注入した標準試料は、1 mM に調製した NaF, KI, NaBr, NaCl およびこれらの混合試料溶液を用いた。

4.3. 結果と考察

4.3.1. ジルコニアの物性に与える修飾回数の影響

はじめに、ジルコニアの物性に与える DETA の修飾回数の影響について、FT-IR を用いて調べた。Fig. 4 に示されるように、アミン (N-H) の吸収帯 $1640\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ においてアミノ基に由来する吸収が見られ、修飾回数を増やすごとに吸収スペクトルは増加していた。しかし、3 回修飾したジルコニアでは 2 回修飾のときよりもスペクトルが低くなる結果となった。ここから、ジルコニアの表面積が小さいために DETA を固定化できるサイトが少なく、2 回の操作で修飾が飽和した状態となり、3 回の操作では DETA を安定的に修飾することができず剥がれ落ちたと考えられる。

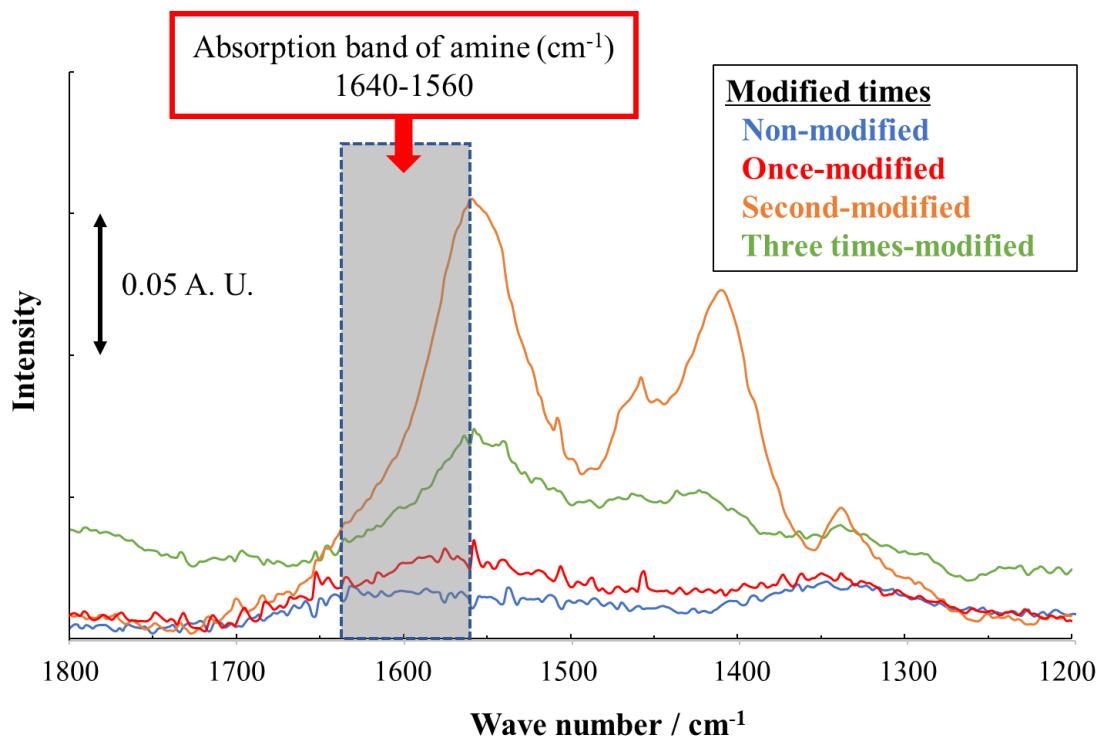


Fig. 4 Infrared absorption spectra of zirconia and DETA-ZrO₂.

次に、ゼータ電位測定装置を用いた表面電位の測定結果を Fig. 5 に示す。DETA 修飾によって、全体のゼータ電位の上昇が見られた。pH 3~7 では正電荷に帯びており、更に pH 7 よりも高い pH 値では、次第にゼータ電位が減少し、pH 10 以上になると負電荷に転じていることが分かった。塩基性で負電荷になった理由として、修飾した弱塩基性のエチレンジアミンが pH 上昇により脱プロトン化し電気的中性に変化するとともに、基材である ZrO_2 が正電荷から負電荷に変化したためであると考えられる。また、DETA を 3 回修飾したときは、2 回修飾したときよりも全体的にゼータ電位が低い傾向を示した。これは、Fig. 4 に示した赤外吸収スペクトルからも分かるように、3 回修飾ではジルコニア表面の DETA が剥がれ落ちた可能性が考えられる。

溶離液 pH を検討するために等電点となる pH を求めると、 ZrO_2 は文献値 [13] よりも低い pH 4.69 だった。DETA 修飾 1 回の DETA- ZrO_2 の等電点は pH 10.05、修飾 2 回のは pH 10.04、修飾 3 回目のは pH 8.50 となった。

次に、ゼータ電位測定装置を用いた二次粒子径の測定結果を Fig. 6 に示す。この中で、DETA を 2 回修飾した DETA- ZrO_2 は酸性から塩基性にかけて 300 ~ 600 nm の範囲で安定であった。一方、3 回修飾のときは 700 ~ 1400 nm と二次粒子径が全体的に大きくなり、またバラつきも大きくなったことから、上述の結果を考慮すると、表面電荷が不均一なため粒子の凝集が生じているものと考えられる。

以上の物性評価を行った後、Fig. 3 のようにバキュームにて吸引しながら PEEK 製エンブティカラムに充填する作業を行った。未修飾 ZrO_2 は 1.7835 g、1 回修飾した DETA- ZrO_2 は 1.8406 g 充填することができた。一方、2 回・3 回修飾した DETA- ZrO_2 は粒子が凝集しやすく、充填の早い段階でカラムが詰まってしまいイオンクロマトグラフ装置による通液が困難となったため、十分に分離定量できる充填剤の容量まで充填することができなかった。よって、次章以降では未修飾のジルコニアを充填したカラム (ZrO_2 カラム) と、1 回修飾したジルコニアを充填したカラム (DETA- ZrO_2 カラム) の 2 本を用いて IC への応用実験を行うこととした。

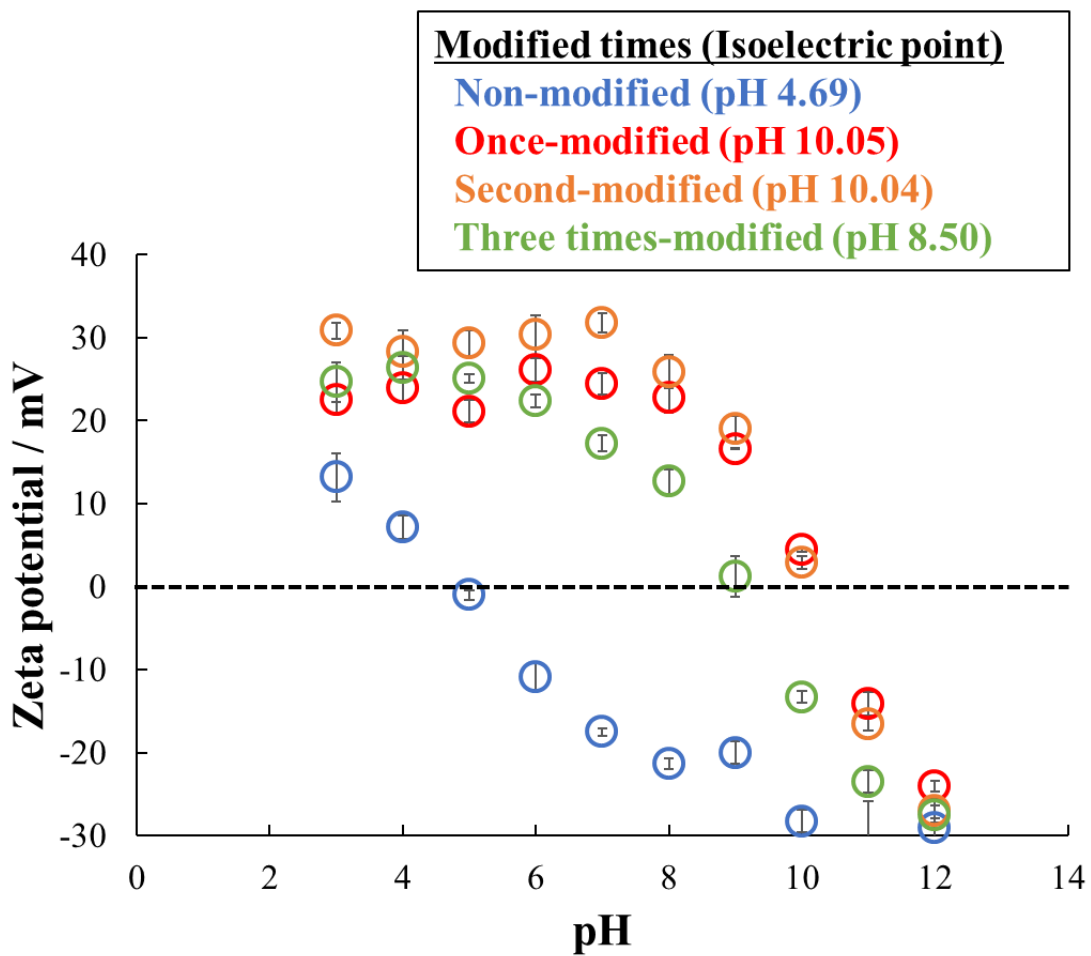


Fig. 5 The effect of modification frequency on zeta potential changes of zirconia.

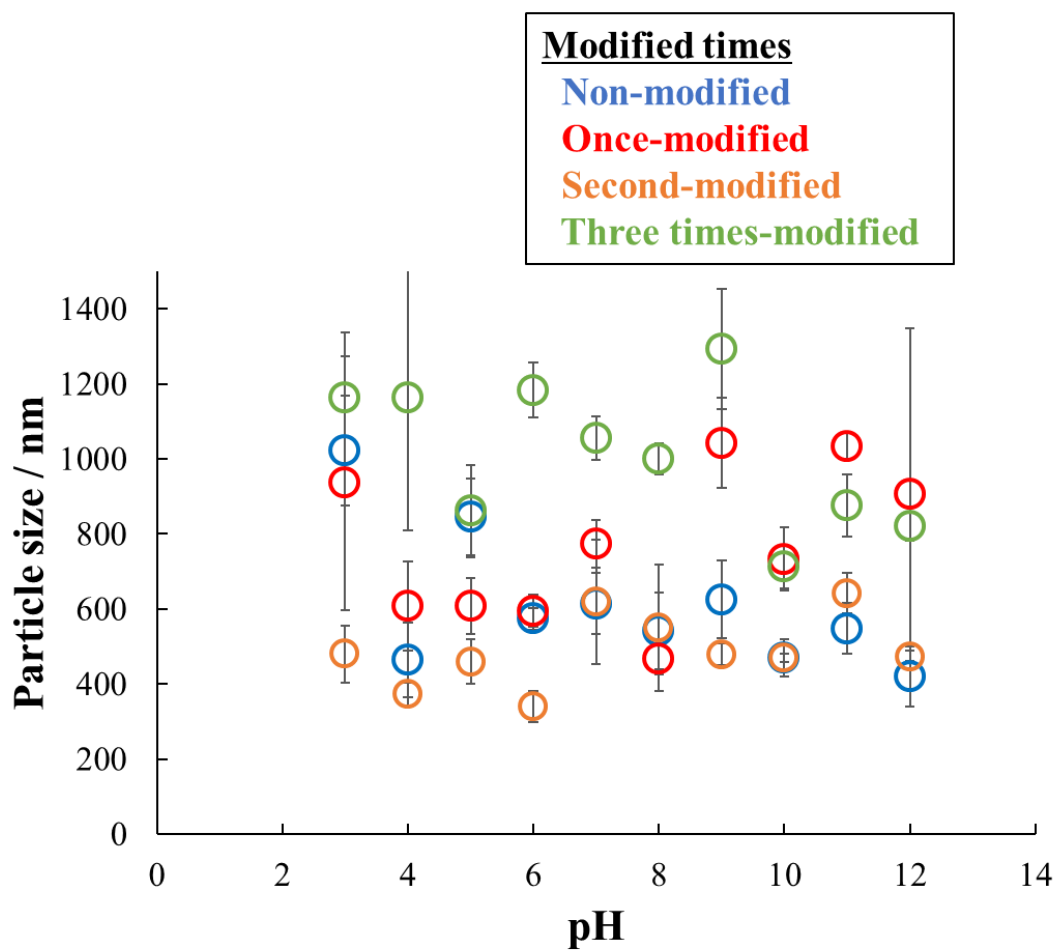


Fig. 6 The effect of modification frequency on particle size changes of zirconia.

4.3.2. 陰イオンの分離挙動に対する溶離液 pH の影響

はじめに、4.3.1.で作製した2本のジルコニアカラム (ZrO_2 カラム, DETA- ZrO_2 カラム) を用いて Fを含む陰イオンの分離挙動に及ぼす溶離液 pH の影響を調べた。溶離液は炭酸水素ナトリウム/炭酸ナトリウム緩衝液を用い, pH8.55, 10.38, 11.07 に調整し, NaF, KI, NaBr 及び NaCl の混合溶液 (各 1 mM) を注入した。Fig. 5 の結果から, 修飾することで Fを除く他の陰イオンは固定相に対し静電的に保持され, Fは配位子交換作用によって固定相に強く保持されて [8] 4種の無機陰イオンを分離することができると予想していたが, Fig. 7 に示されるように Fを除く他の陰イオンは Fは修飾の有無に関わらず溶離液 pH が低くなるとより強く保持された。これは, 溶離液が塩基性であるために ZrO_2 の表面が負電荷に帯電し, 陰イオンに対する静電的吸着が生じなかったためと考えられる [8, 14].

次に, 溶離液 pH を酸性と中性にしたときの DETA- ZrO_2 カラムにおける陰イオンの保持挙動を調べた。このとき, 溶離液は 5 mM フタル酸 (pH 2.69) および 5 mM フタル酸ナトリウム (pH 6.98) を用いた。その結果, フタル酸溶離液を用いた場合 (Fig. 8-a) では, 溶離液ディップからは分離できたものの, 正方向に検出された Cl, Br 及び I と, 負方向に検出された Fの分離は得られなかった。一方, 中性のフタル酸ナトリウムを用いた場合 (Fig. 8-b) では, Fはジルコニアに強く保持され測定時間内 (40 分) に検出されず, 他の陰イオン (Cl, Br 及び I) は溶離液ディップの直前に正方向に検出されたが, 保持時間が重なったため分離することができなかった。これは, 溶離液が酸性および中性であるために ZrO_2 の表面が正電荷に帯電し, 陰イオンが強く保持され溶離することができなくなったものと考えられる。

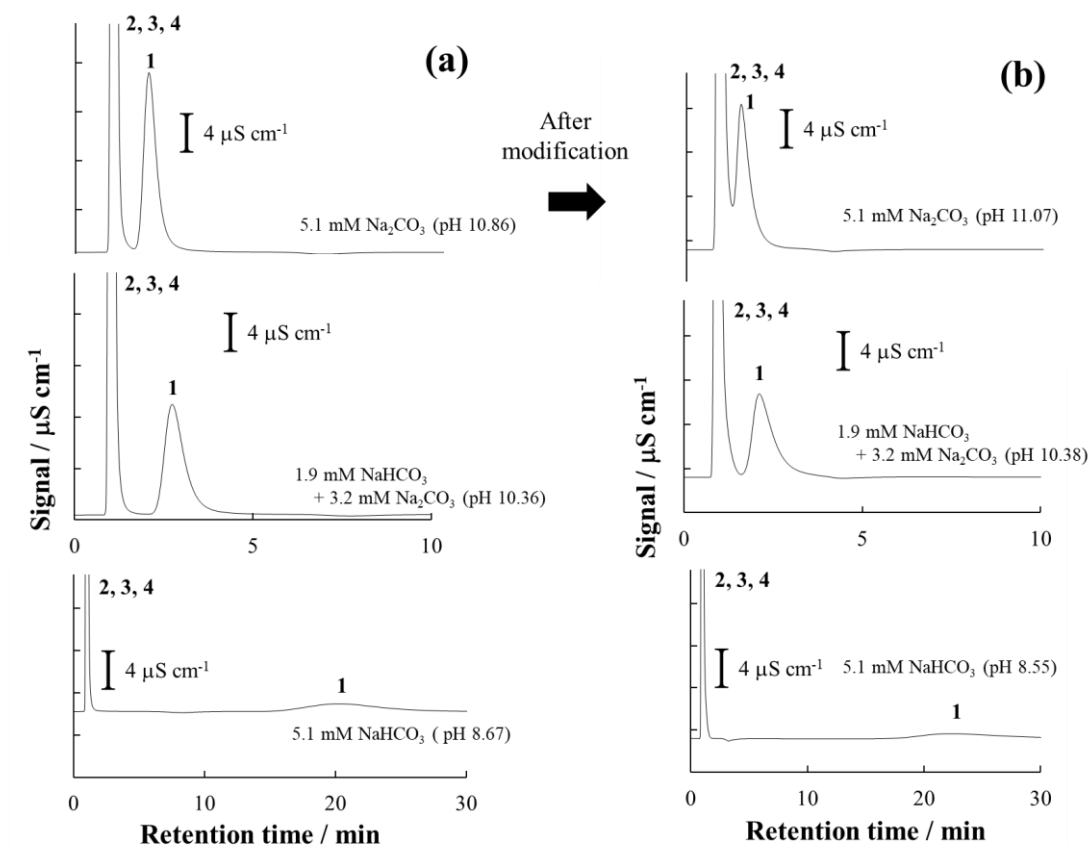


Fig. 7 Chromatograms of F^- separation. Eluent: 1.9 mM NaHCO_3 + 3.2 mM Na_2CO_3 , 5.1 mM Na_2CO_3 , 5.1 mM NaHCO_3 . Column: (a) ZrO_2 column (b) DETA- ZrO_2 column. Injected samples: a mixture of inorganic halogen compounds (1 mM each). Peak identity: 1- F^- , 2- Cl^- , 3- Br^- , 4- I^- . Other conditions are described in the experimental section.

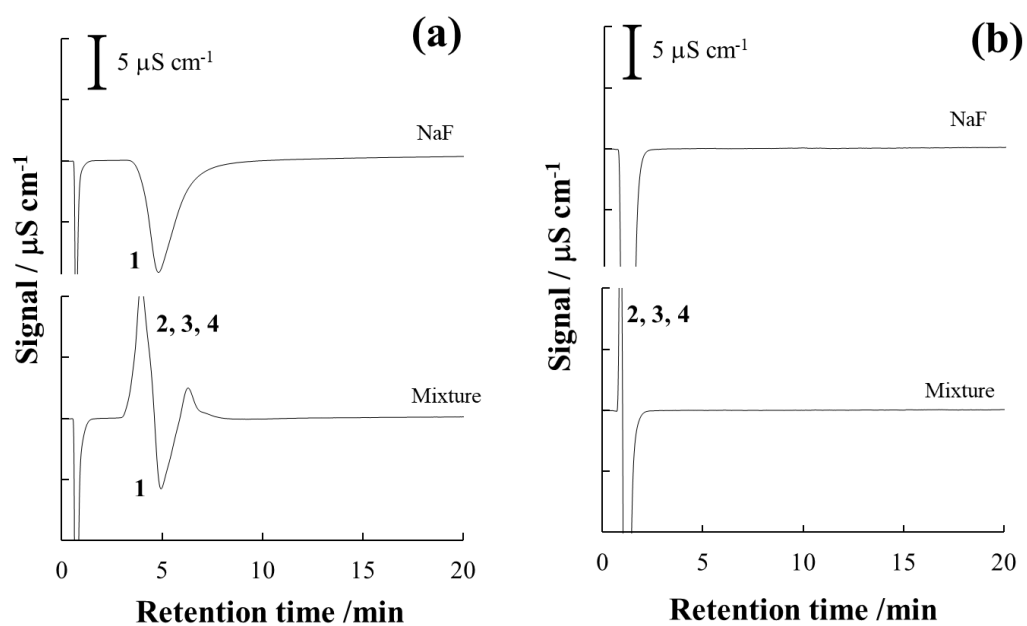


Fig. 8 Chromatograms of inorganic anions. Column: DETA-ZrO₂ column. Eluent: (a) 5mM phthalic acid (pH2.69) and (b) 5mM sodium phthalate (pH 6.98). Injected samples: a mixture of inorganic halogen compounds (1 mM each). Peak identity: 1-F⁻,2-Cl⁻, 3-Br⁻, 4-I⁻. The other conditions are described in the experimental section.

4.3.3. カラム性能評価

4.3.2 にて、DETA-ZrO₂ を充填したカラムによる陰イオンの分離では塩基性条件下において F の分離が見られたが、この結果は未修飾の ZrO₂ を充填したカラムと変わるものではなかった。そこで、F の保持挙動（保持時間、理論段数等）が修飾前後で変化を示したのかをカラム別に評価した。

Table 1 に示すように、ZrO₂ カラムと DETA-ZrO₂ カラムの理論段数は 2 桁～3 桁と、IC で示されるイオンのピークとしては低い値を示した。また、ピーク面積はカラムによる違いが見受けられなかった。これは ZrO₂ に対する F の吸着が、DETA-ZrO₂ での静電的なイオン交換作用よりもはるかに強いことが影響しているものと思われる。すなわち、ZrO₂ と F の間には配位子交換反応によって強く結合している可能性があり、その結果、保持時間に関わらずピークがブロード化したと考えられる。理論段数はカラム長さに影響するので、充填するカラム管を長くすることで改善するものと考えられるが、溶液組成についても検討が必要である。

Table 1 The analytical performances of zirconia columns for fluoride ion.

Column	Eluent	Retention time / min	Peak area / $\mu\text{S cm}$	Peak height / μS	Theoretical plate number	Resolution
ZrO ₂	5.1 mM NaHCO ₃	20.3	366	0.900	60	3.6
	5.1 mM Na ₂ CO ₃	1.99	440	17.9	163	2.4
	1.9 mM NaHCO ₃ + 3.2 mM Na ₂ CO ₃	2.74	421	10.6	119	2.8
DETA-ZrO ₂	5.1 mM NaHCO ₃	22.6	292	0.576	46	3.2
	5.1 mM Na ₂ CO ₃	1.54	475	16.5	87	1.5
	1.9 mM NaHCO ₃ + 3.2 mM Na ₂ CO ₃	2.11	385	9.19	70	2.0
	5 mM Phthalic acid	4.88	276	6.41	241	0.79
	5 mM Sodium phthalate	1.17	1387	104	200	1.0

4. 4. 結論

本章では、これまで IC の固定相として報告の少ないジルコニア固定相のクロマトグラフ特性を明らかにするため、球状ジルコニアの焼成からカラム充填までを独自に行い、陰イオンの分離挙動の検討と F に対するカラムの分離性能評価を行った。本章で作製した 2 本の DETA ジルコニアカラムでは、F に対し配位子交換作用に基づく強い吸着を示したが、他の陰イオン (Cl⁻, Br⁻ 及び I⁻) の良好な分離を得ることはできなかった。

今後は、陰イオンの保持挙動を制御するために、カラム長や溶離液条件の他に、修飾する陰イオン交換基の種類、ジルコニアの焼結条件など、充填剤の作製条件も検討項目に加える。

4. 5. 参考文献

- [1] A. J. Alpert, *J. Chromatogr. A*, **499**, 177–196 (1990).
- [2] P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, **29**, 1784–1821 (2006).
- [3] P. Jandera, *J. Sep. Sci.*, **31**, 1421–1437 (2008).
- [4] R. Kucera, P. Kovarikova, M. Klivicky, and J. Klimes, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 6981–6986 (2011).
- [5] Q. Wang, J. Li, X. Yang, L. Xu, Z. Shi, and L. Xu, *Talanta*, **129**, 438–447 (2014).
- [6] J. Nawrocki, M. P. Rigney, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A*, **657**, 229–282 (1993).
- [7] A. E. Regazzoni, M. A. Blesa, A. J. G. Maroto, *J. Colloid Interface Sci.*, **91**, 560–570 (1983).
- [8] 金井朝子, 2016 年度群馬大学大学院理工学府 環境創生理工学教育プログラム (環境エネルギーコース) 修士学位論文, 2–8 (2017).
- [9] M. Mori, T. Masuno, A. Kanai, and D. Kozaki, *Bunseki Kagaku* (Japanese), **68**, 241–251 (2019).
- [10] K. Kubo, S. Hosokawa, S. Furukawa, S. Iwamoto, and M. Inoue, *J. Mater. Sci.*, **43**, 2198–2205 (2008).
- [11] M. Inoue, *J. Phys.: Condensed Matter*, **16**, 1291–1303 (2004).
- [12] 杉山歩哉, 岩本伸司, 石油学会第 61 回年会 (第 67 回研究発表会) 年会・秋季大会 講演要旨集, C08 (2018).
- [13] H. Imai, J. Nomura, Y. Ishibashi, T. Konishi, *Nippon Kagaku Kaishi* (Japanese), **5**, 807–813 (1987).
- [14] J. Nawrocki, C. J. Dunlap, P. W. Carr, *J. A. Blackwell, Biotechnol. Prog.*, **10**, 561–573

(1994).

第5章 結言

5.1. 結論

本研究では、測定条件を変えずに複数のイオン種を1回の測定で定量できる安価なカラムシステムを本研究で目指す同時分離法と定義し、環境水中に含まれる無機イオンを対象としてICを用いた同時分離法の開発を進めた。以下に各章で得られた知見についてまとめる。

第1章では、現代の水環境問題が地球の水循環に深く関わること、また、この解決に際して行われる技術開発では国家間の格差をなくすようなものが社会から求められていることを述べた。その上で、水質評価技術におけるICの優位性と課題を確認し、本研究の意義と課題に対するアプローチを提示した。

第2章では、イオン交換樹脂を固定相とした陰イオン交換ガードカラムと陽イオン交換分離カラムを接続し、酸性溶離液を組み合わせることで電荷の異なる無機イオンの同時分離法の開発を行った。本法により、分離カラム同士の接続で発生するカラム圧の上昇を抑えながら9種のイオンを分離することができた。しかし、1価弱酸イオンの分離能を改善すること、保持時間の長期化を抑制することが課題となった。

第3章では、第2章の結果を踏まえ、シリカゲルを固定相としたカラムと酸性溶離液を組み合わせることで無機陰イオンの同時分離を試みた。酒石酸を用いることで、溶離液中の酸濃度に依存した保持時間の減少が見られ、イオン交換基を持たないシリカゲル固定相でも無機陰イオンを分離することができた。

第4章では、第3章の結果を踏まえ、IC固定相として報告の例が少ないジルコニア固定相を用い、無機陰イオンの同時分離を試みた。球状ジルコニアにDETAを用いてアミノ基の修飾を行い、物性と陰イオン分離挙動への影響を検討した。その結果、第3章で用いたジオールカラムと同様、Fは固定相に対して強い吸着を示したが、塩基性溶離液を用いた場合にブロードすることなく他の陰イオンから完全に分離することができた。今後も、溶離液条件や陰イオン交換基の種類、ジルコニアの焼成条件を変え、更に検討を進めていく。

5.2. 本研究の展望

以上から、本研究ではカラム充填剤と溶離液の組み合わせを最適化することによって同時分離法における新たな知見を得ることができた。また、本研究で取り組んだ成果

の一部は操作性の高い安価な水質評価技術に組み込めるポテンシャルを有していることから、今後も継続して研究を進めたい。

更に、近年の IC は水道水や河川水等の水質管理分野だけでなく、特にバイオ医薬品中タンパク質の多成分同時定量 [1, 2] や、リチウムイオンバッテリー電解質中のイオン性物質の定量分析 [3, 4] にも用いられており、またオンサイトでの迅速な分析が可能となるポータブル IC に関する研究 [5, 6] も進んでいることから、今後も求められる分野は拡大していくと考えられる。これに加え、本研究で提案した同時分離法は 5.1. に示した課題を克服することができれば、日本国内に限らず世界中の国々で適用される可能性があり、1.1 で述べた現代の水環境問題の解決と国家間の技術格差の是正に資する分析技術として貢献できる。

今後は本研究の特徴である導入のしやすさを追求するために、今回報告した分離系のさらなる向上、シリカゲルやジルコニア等、これまで固定相として使用されなかった材料を用いて高精度な IC を開発し続けるとともに、得られた結果を活用して水環境問題の解決や SDGs ゴールの達成に貢献していきたい。

5.3. 参考文献

- [1] A. Kristl, P. Lokosek, M. Pompe, and A. Podgornik, *J. Chromatogr. A*, **1597**, 89–99 (2019)
- [2] A. Murisier, M. Lauber, S. J. Shiner, D. Guillarme, and S. Fekete, *J. Chromatogr. A*, **1604**, 460–487 (2019)
- [3] W. Weber, R. Wagner, B. Streipert, V. Kraft, M. Winter, and S. Nowak, *J. Power Sources*, **306**, 193–199 (2016)
- [4] V. Kraft, M. Grutzke, W. Weber, J. Menzel, S. Wiemers-Meyer, M. Winer, and S. Nowak, *J. Chromatogr. A*, **1409**, 201–209 (2015)
- [5] E. Muray, P. Roche, K. Harrington, M. McCaul, B. Moore, A. Morrin, D. Diamond, and B. Paull, *J. Chromatogr. A*, **1603**, 8–14 (2019)
- [6] K. R. Elkin, *J. Chromatogr. A*, **1352**, 38–45 (2014)