

## 8. 高速液体クロマトグラフィーによる硝酸イオンと亜硝酸イオンの同時分析

Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite Ion by High Performance Liquid Chromatography

高橋 篤

Atsushi TAKAHASHI

### 1. 緒 言

近年、窒素やリン化合物などのいわゆる栄養塩類による公共水域の汚染が問題となってきた。それらの中でも硝酸および亜硝酸イオンは窒素化合物の主要な代謝産物であり、栄養塩類による汚染状況を把握するには両者の分析が必要とされる。従来、硝酸イオンはブルシン法<sup>1)</sup>、亜硝酸イオンはGR法<sup>2)</sup>などの比色法で分析されてきたが、最近では簡易な分析法として紫外外部吸光度法に関する研究が盛んになりつつある。それらは硝酸あるいは亜硝酸イオンの示す強い紫外吸収を利用したもので、両者の吸収スペクトルがほとんど同一であるため原理的には両イオン濃度の合計値を測定する方法である<sup>3)</sup>。しかしこの方法は操作が簡単である反面、有機物その他の紫外吸収物質の影響を受けやすいことと検出感度が低いことなどの問題点がある。これらの問題点は最近登場した高分離能イオン交換型充てん剤と紫外分光型検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによれば総て解決される。すなわち硝酸イオンと亜硝酸イオンの同時分析が可能なこと、ngオーダーの高感度分析が可能なこと、サンプル量は10 $\mu$ l前後で充分なこと、分析時間は10分程度ですむことなどの特徴がある。今回、以上のような多くの利点をもつ高速液体クロマトグラフィーにより硝酸イオンと亜硝酸イオンの同時分析を行い、満足すべき結果を得たので報告する。

### 2. 実 験

#### 2.1 試薬

充てん剤：強塩基性陰イオン交換型

- ① ポーラスポリマー型：東洋曹達製 IEX220SA (粒子径  $12 \pm 2 \mu$ , イオン交換容量  $3.7 \text{ meq/g}$  以上)。
- ② ポーラスシリカ型：同 IEX260SA-SIL ( $10 \pm 2 \mu$ ,  $0.5 \text{ meq/g}$  以上)。  
ワットマン製 Partisil 10 SAX ( $10 \mu$ ,  $1 \text{ meq/g}$ )。
- ③ ベリキュラー型：日本分光製 AVO2 ( $25 \sim 35 \mu$ ,  $0.2 \sim 0.3 \text{ meq/g}$ )。

その他の試薬は総て特級品を用いた。

#### 2.2 装置

高速液体クロマトグラフ：日本分光トライローター型。

検出器：日本分光 UVIDEC 100 II 紫外分光型。

### 2.3 カラムの充てん

① IEX 220 SA は 0.05 M リン酸 1 カリウム溶液による分散法で、② IEX 260 SA と Partisil 10 SAX はグリセリン 35 V/V%，エタノール 65 V/V% 溶媒による平衡スラリー法でそれぞれ内径 4.6 mm 長さ 25 cm のステンレス製カラムに充てんした。③ AV02 は乾式法で内径 2.3 mm 長さ 50 cm のステンレス製カラムに充てんした。

### 2.4 分析方法

試料は孔径 0.45  $\mu$  のミリポアフィルターで濾過し、その 5~10  $\mu$ l をマイクロシリンジでルーブインジェクターに注入する液体クロマトグラフは流速 1 ml/min で溶離液を流し検出波長 205 nm で測定し、ピーク高さの比から定量した。

## 3. 結果

### 3.1 分離条件の検討

#### 3.1.1 充てん剤の選定

高速液体クロマトグラフィー用のイオン交換型充てん剤は、①ポーラスポリマー型、②ポーラスシリカ型、③ペリキュラー型の3種類に大別される。①の型のもはイオン交換容量が最も大きく硝酸イオンや亜硝酸イオンのように選択係数の大きなイオンは強く吸着されてしまい、高濃度の酸<sup>4)</sup>あるいはアルカリ溶液を用いないと溶出しない。したがってポンプ部や配管部に及ぼす影響ならびにバックグラウンドの上昇による検出感度の低下などの問題点が考えられる。本実験では IEX 220 SA を用いたが、やはり低濃度の酸あるいはアルカリ溶液を移動相とした場合には硝酸および亜硝酸イオンとも全く溶出せず分析は不可能であった。②の型としては IEX 260 SA と Partisil 10 SAX を用いた。どちらも 0.05 M 以下という低濃度のリン酸 1 カリウム溶液を移動相としたとき、10 分前後の保持時間で硝酸あるいは亜硝酸イオンを分離した。③の型では Permaphase AAX による分析例<sup>5)</sup>があるが、粒子径が大きいため理論段数が低いこと、交換容量が小さいためにイオン濃度の高い試料を分析するにはカラムサイズを大きくしなければならないことなどの問題点がある。本実験では AV02 を用いたが、交換容量が小さすぎるためか硝酸および亜硝酸イオンとも全く保持されなかった。

以上の結果からも充てん剤としては IEX 260 SA-SIL と Partisil 10 SAX を用いてさらに検討を進めた。

#### 3.1.2 移動相の検討

IEX 260 SA-SIL ならびに Partisil 10 SAX を固定相とし移動相としたリン酸 1 カリウム溶液の濃度を变化させて硝酸および亜硝酸イオンの保持時間を測定した。(図 1, 2)

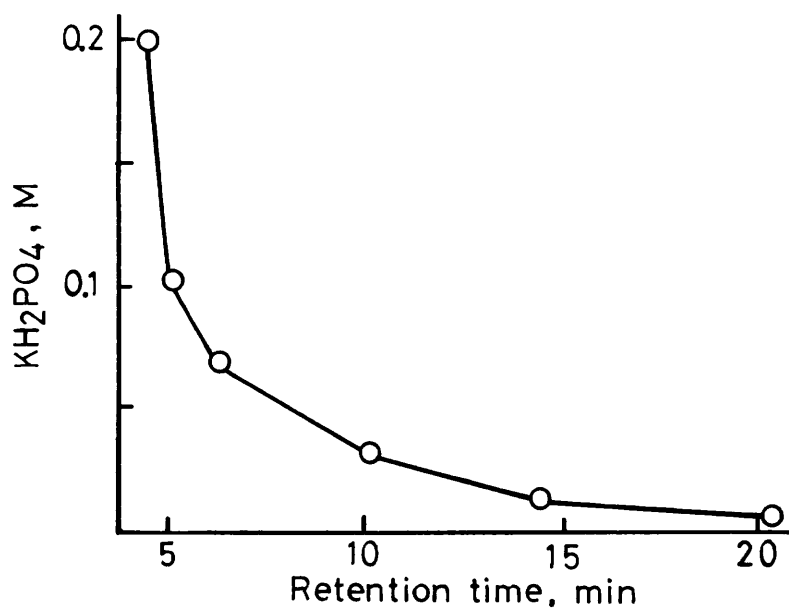


図1. IEX 260 SA における硝酸イオンの保持時間の変化

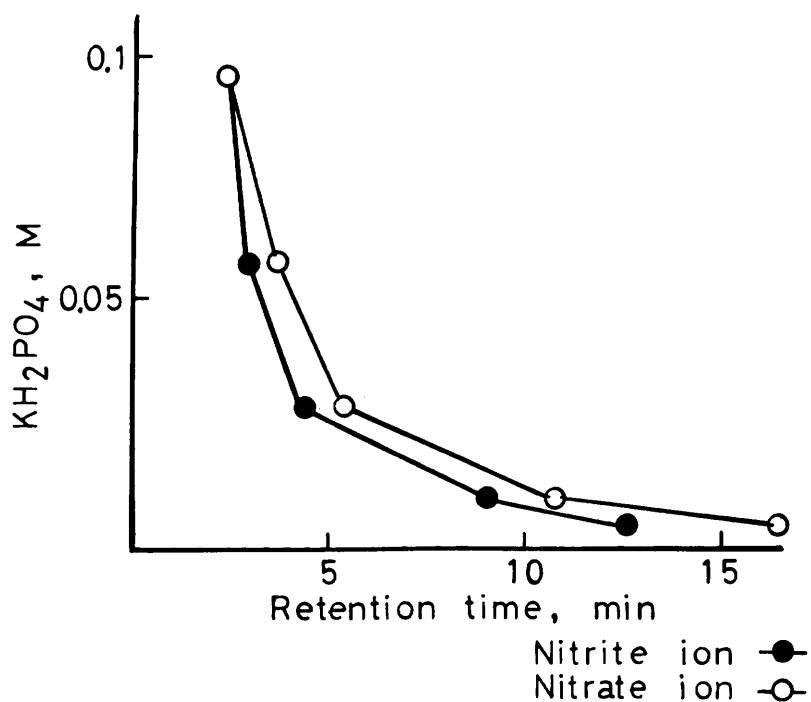


図2. Partisil 10 SAX における硝酸イオンと亜硝酸イオンの保持時間の変化

IEX 260 では硝酸イオンと亜硝酸イオンの相互分離はできなかったものの、どちらの充てん剤も塩濃度の低下とともに保持時間は増加した。そこでPartisil 10 では両イオンの分離度の点から濃度 0.01M を、IEX 260 ではほぼ同様の保持時間を示す 0.03M リン酸 1 カリウム溶液を移動相とした。

### 3.1.3 カラム効率

カラムの分離性能すなわちカラム効率は理論段数 (N) あるいは一理論段相当高さ (HETP) で表わすことができる。理論段数およびHETPは単一化学種の溶出曲線におけるピーク幅(W) 保持時間 (TR), カラム長さ (ℓ) から次式より求める。

$$N = 16 \left( \frac{TR}{W} \right)^2, \quad HETP = \frac{\ell}{n}$$

そこで濃度 50 ppm の硝酸および亜硝酸イオン溶液 5 μℓ を注入し, 流速 1 ml/min で溶出させて各カラムの保持時間とピーク幅を測定しカラム効率を求めた (図3, 4)。Partisil 10 では理論段数は約 7000 段であり, この値は 1 m 当り 28000 段に相当し非常に分離性能のすぐれたカラムといえる。

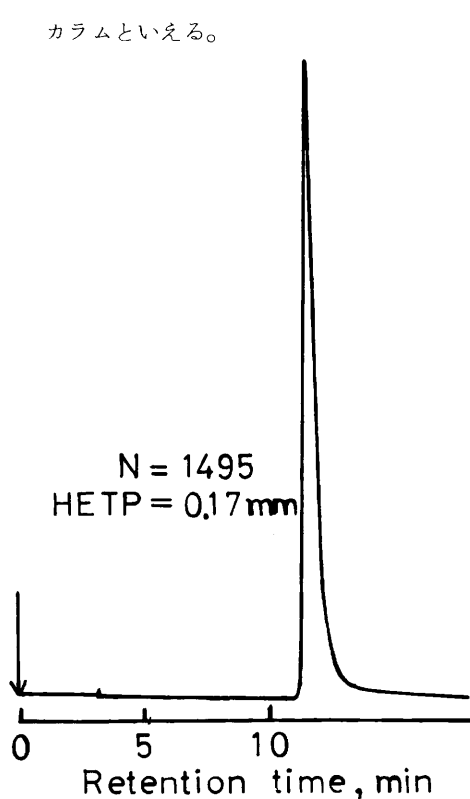


図3. IEX260 SAのカラム効率

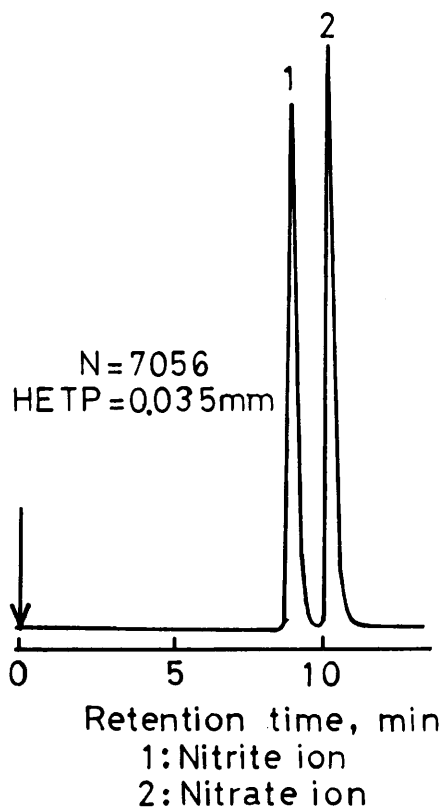


図4. Partisil 10 SAXのカラム効率

以上分離条件を検討した結果, 充てん剤としては硝酸イオンと亜硝酸イオンの相互分離が可能なこと, カラム効率がすぐれていることからPartisil 10 SAXを, 移動相としては 0.01M リン酸 1 カリウム溶液を用いて分析を行うことにした。

### 3.2 検量線

濃度 10 ppm の硝酸および亜硝酸イオン標準液 1 ~ 10  $\mu\text{l}$  をマイクロシリンジで注入しピーク高さを測定した。いずれも 0 ~ 100 ng の範囲で原点を通る直線となった(図 5)。

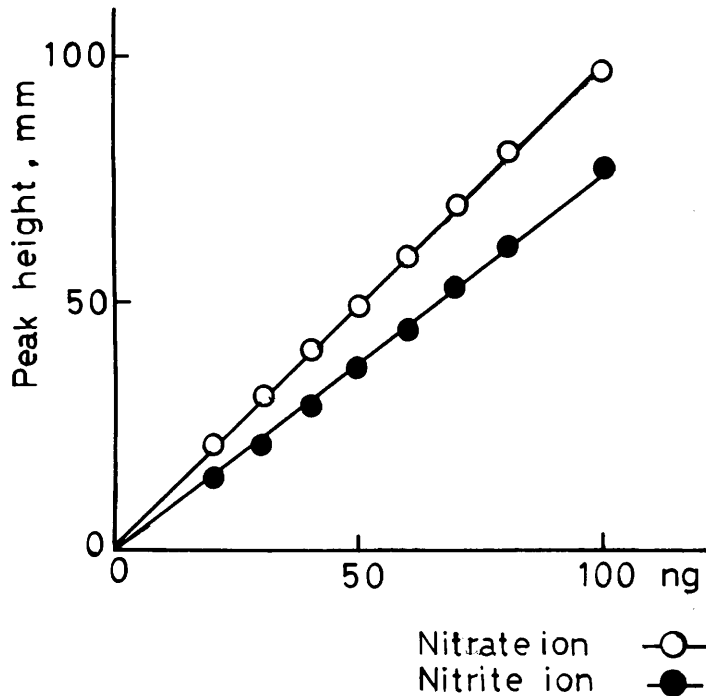


図 5. 硝酸, 亜硝酸イオンの検量線

### 3.3 分析精度の検討

河川水を試料とし, その 10  $\mu\text{l}$  について硝酸および亜硝酸イオンのピーク高さを測定した。この操作を 5 回行い変動係数を求めた。亜硝酸イオンはピーク高さ 30 mm で変動係数 0%, 硝酸イオンは高さ 93 mm で変動係数 0.48% であった。

### 3.4 河川水への応用

河川水 6 試料について本実験で定めた方法により硝酸および亜硝酸イオンを定量した。さらに硝酸イオンはフェノールジスルホン酸法<sup>6)</sup>で, 亜硝酸イオンはスルファミン・ナフチルエチレンジアミン法<sup>7)</sup>で定量し比較した(表 1)。

表 1. 河川水の分析結果

( ppm )

項目 方 法 試料	硝 酸 イ オ ン		亜 硝 酸 イ オ ン	
	高速液クロ	フェノール ジスルホン酸法	高速液クロ	ナフチルエチ レンジアミン法
1	3.7	3.7	0.75	0.77
2	5.0	4.8	1.45	1.45
3	12.8	12.8	5.60	5.45
4	9.5	5.9	2.60	2.25
5	12.4	6.6	2.90	2.73
6	14.0	14.8	0.85	0.77
Ratio	液クロ/比色 = 125% (a.v.)		液クロ/比色 = 105% (a.v.)	

各試料とも比色法とよく一致した結果が得られた。また硝酸イオンと亜硝酸イオンを比較すると低濃度にもかかわらず亜硝酸イオンの定量値のほうがよく一致している。これはスルファミン・ナフチルエチレンジアミン法の精度がフェノールジスルホン酸法よりもすぐれているためと思われる。

#### 4. 結 語

固定相としてポーラスシリカ型の強塩基性陰イオン交換充てん剤を、移動相として0.01Mリン酸1カリウム溶液を用いた高速液体クロマトグラフィーにより、河川水中の硝酸イオンと亜硝酸イオンをngオーダーで同時分析した。分析時間約10分、サンプル量5~10 $\mu$ l、変動係数0.5%以下で、従来の比色法ともよく一致する結果が得られた。

#### 文 献

- 1) J I S K o 1 0 2 ( 1 9 7 1 ) 。
- 2) " " " " " "
- 3) 日色和夫, 川原昭宣, 田中 孝: 分析化学, **27**, 278 ( 1 9 7 8 ) 。
- 4) R. J. Davenport : Anal. Chem., **46**, 1971 ( 1 9 7 4 ) 。
- 5) 神浦俊一, 田中正宣: 日本分析化学会第27年会講演要旨集, P351 ( 1 9 7 8 ) 。
- 6) 上水試験法, ( 日本水道協会 ), ( 1 9 7 0 ) 。
- 7) 衛生試験法注解, ( 日本薬学会 ), ( 1 9 7 3 ) 。