

イオンクロマトグラフィー用分離カラムの簡便な調製法

実政 勲[®], 溝口岳美, 大塚淳子, 出口俊雄, 永井英夫*

(1983年1月14日受理)

Aminex 系イオン交換体を Dowex 系イオン交換樹脂に重量比 1:2 の割合で純水中で混合・吸着させイオンクロマトグラフィー (IC) 用分離カラムの充てん剤として用いた。陰イオンの分離には, Aminex A-27 (13.5 μm) と Dowex 50W-X16 {(200~400)メッシュ}, 陽イオンの分離には, Aminex A-5 (13 μm) と Dowex 1-XB {(200~400)メッシュ} を組み合わせた。調製した混合樹脂を内径 1 mm のテフロンチューブに詰めて分離カラムとした。7種の陰イオン (F^- , Cl^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) を分離カラム長さ 20 cm, 1.0 mM 炭酸水素ナトリウム-2.0 mM 炭酸ナトリウム溶離液, 流速 1 ml min⁻¹ の条件で 60 分で分離した。6種の一価陽イオン (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) を分離カラム長さ (13~15) cm, 5 mM 塩酸溶離液, 流速 0.5 ml min⁻¹ の条件で 100 分で分離した。溶離液として 1.25 mM 二塩酸 *m*-フェニレンジアミン-1.25 mM 塩酸を用いると, 6種の一価陽イオン混合物に相当する単一のピークに続いて 4種の二価陽イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) が相互に分離され, 分離カラム長さ 13 cm, 流速 0.5 ml min⁻¹ の条件で Ba^{2+} が溶離されるのに 110 分を要した。市販の IC カラムに比べ分離に長時間を要するが分離能は満足できるものであった。

1 緒 言

Small ら¹⁾によって創案されたイオンクロマトグラフィー (IC) は陰イオン及び陽イオンの分離測定のための有力な手段であり, 市販装置の普及とあいまって日常分析に威力を発揮しつつある。一方, 分離分析を補助目的とする者にとって IC 法の有用性は認識してもそれ専用の装置を特別に購入するのは経済的負担が大きい。そこで, IC 用分離カラムの簡便な調製を目的として研究を行った。

IC 分離カラム用の低交換容量のイオン交換体としては, スチレン-ジビニルベンゼン共重合体の表面をスルホン化したもの (陽イオンの分離), これに更に微細な陰イオン交換樹脂をアミノーションして付着させたもの (陰イオンの分離) が通常用いられている²⁾。一方高速液体クロマトグラフィー用充てん剤として開発されたイオン交換体 (スチレン-ジビニルベンゼン共重合体の表面にスルホン基あるいは第4級アミンを導入したものは, それ自身は交換容量が大きすぎて IC 用分離カラムに用いることはできない。しかし通常のイオン交換樹脂の表面に高速液体クロマトグラフィー用イオン交換体を付着させることにより IC に用いられるのではないかと考

え, 陰イオン及び陽イオンの分離条件を検討した。

2 実 験

2.1 イオン交換樹脂及び試薬

イオン交換樹脂: 使用目的に応じて, Table 1 に記した Aminex[®] (Bio-Rad 社製高速液体クロマトグラフィー用イオン交換体) と Dowex[®] イオン交換樹脂を用いた。Dowex 樹脂は水中デカンテーション法により微細粒子を取り除き, 分離カラムに用いる場合は風乾し, 陰イオン交換樹脂を除去カラムとして用いる場合は OH⁻形にした。

試薬: 市販の特級品を使用し Table 1 に記した溶離液及び試料溶液 (陰イオン試料はナトリウム塩, 陽イオン試料は塩化物を用いた。リン酸試料として用いたリン酸ナトリウムは使用した溶離液の条件では HPO_4^{2-} イオンとして存在する) を調製した。純水はイオン交換水をガラス製蒸留器で蒸留したものをを用いた。

2.2 装 置

溶離液槽 (500 ml ポリエチレン製), 高压用定流量ポンプ (日本分光 Tri Rotar III 型あるいは協和精密 KHD-94 型), 六方バルブインジェクター (日本分光 HV-612 型), ガラス製除去カラム (カラムの大きさは Table 1 に示す), 電導度計 (Milton Roy Model 701) セルをこの順序にテフロンチューブ (内径 1 mm, 外径 3 mm) で接続した。サンプルインジェクターと除去カラムをつないだ長さ 25 cm のチューブの除去カラム側の

* 熊本大学理学部化学科: 熊本県熊本市黒髪 2-39-1

Table 1 Resins used for separation- and suppressor columns and the optimum IC conditions^{a)}

	Separation of anions (F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻)	Separation of cations (Li ⁺ , Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺) (Li ⁺ to Cs ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺)
Separation column	Aminex A-27 (Acetate-form, 13.5 μm)/Dowex 50 W-X16 (H ⁺ -form, (200~400) mesh); Weight ratio of Aminex to Dowex: 1:2; 1 mm×20 cm	Aminex A-5 (Na ⁺ -form, 13 μm)/Dowex 1-X8 {Cl ⁻ -form, (200~400) mesh}; Weight ratio of Aminex to Dowex: 1:2; 1 mm×(13~15)cm for monovalent cations, 1 mm×13 cm for divalent cations
Suppressor column	Dowex 50 W-X8 {H ⁺ -form, (100~200) mesh}; 8 mm×25 cm	Dowex 1-X8 {OH ⁻ -form, (100~200)mesh}; 9 mm×35 cm
Eluent	1.0 mM NaHCO ₃ /2.0 mM Na ₂ CO ₃	5 mM HCl for monovalent cations, 1.25 mM <i>m</i> -phenylenediamine dihydrochloride/1.25 mM HCl for divalent cations
Flow rate	1.0 ml min ⁻¹	0.5 ml min ⁻¹

a) Sample volume injected: 100 μl

一端にラインフィルター (協和精密 KLF-U 型) を取り付け分離カラムとした。電導度計に記録計 (理化電機工業 R-22 型) を接続してシグナルを記録した。

2.3 分離カラム

分離カラム用混合樹脂は Table 1 に記した Aminex 交換体と Dowex 樹脂を組み合わせて次のようにして調製した。あらかじめ所要重量を量りとおいた Aminex を 100 ml ビーカーに採り約 50 ml の純水を加える。マグネチックスターラーでかくはんしながら風乾した Dowex の一定重量を加える。水相に Aminex の懸濁が認められなくなるまでかくはんする。Aminex と Dowex の混合重量比 1:2 の場合約 3 時間のかくはんを要した。加える Aminex の量がこの割合より多いときは長時間かくはんを続けても水相は透明にならない。Aminex の懸濁物が認められるときは純水で数回デカンテーションして取り除く。Dowex 樹脂は Aminex を吸着することによりかさばった海綿状を呈する。このようにして調製した混合樹脂を、サンプルループがテフロン製である四方バルブインジェクター (協和精密, KMM-4V-2 型) を利用して、分離カラムに所定の長さになるように純水を用いて注入する。以後、このようにして充てんされた樹脂床の長さをカラム長さとする。

2.4 実験条件及び分離能の評価

Aminex 交換体と Dowex 樹脂の混合割合、分離カラムの長さ、流速の影響を調べた。分離液の組成と濃度は、Table 1 に示した。インジェクターから注入する試料の液量は 100 μl である。

分離カラムの分離能を隣接イオン 1, 2 間の分離度 R で評価した。 R は保持時間 t とピーク幅 (単一ピークの二つの変曲点での接線が基線と交わる二点間の距離を時間に換算した値) w から式, $R=2(t_2-t_1)/(w_1+w_2)$,

によって計算した。 $R>1.5$ のとき同じ大きさの二つのピークの分離は完全であり, $R=1.0$ では約 2% のピークの重なりがある。

3 結 果

3.1 陰イオンの分離

3.1.1 樹脂の混合割合 Aminex に対する Dowex の混合重量比を 1:6 から 1:2 の範囲で変えて分離度を調べた。Aminex : Dowex が 1:6~1:4 では有効な分離は認められなかった。流速 1.0 ml min⁻¹, カラム長さ 20 cm の条件で Aminex : Dowex が 1:3~1:2 のときの分離度を Fig. 1 に示した。Dowex に対する Aminex の付加量が増えるほど分離はよくなるが溶解に時間がかかる。

3.1.2 分離カラムの長さ Aminex と Dowex を重量比 1:2 に混合した樹脂を (8, 12, 20) cm の 3 段階の長さで詰めた分離カラムについて、流速 1.0 ml min⁻¹ の条件で分離度を調べた。8 cm のカラムでは F⁻-Cl⁻ 以外はいずれも分離度は 1 に達しなかった。12 cm のカラムでは Br⁻-NO₃⁻ の分離度は 0.7 で、それ以外はいずれも分離度は 1 を越えた。カラムの長さを 20 cm にすると Br⁻-NO₃⁻ の分離度は 0.9 に増加し、それ以外の成分の分離はほぼ完全であった。充てんカラムは長いほど分離はよくなるが溶解に時間がかかる。F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, HPO₄²⁻, Br⁻ の 5 種類の陰イオンを分離するときは 12 cm のカラムで十分に目的が達せられる。

3.1.3 流速 樹脂の混合割合やカラム長さによる影響ほど大きな影響は認められなかった。流速が小さくなるほど分離がよくなる傾向が認められたが溶解に時間がかかる。流速を大きくすると分離カラムにかかる圧力が増す。流速は 1 ml min⁻¹ が適当であった。

3.1.4 最適分離条件 最適分離条件を Table 1 に示した。この条件で 7 種の陰イオンを分離したクロマト

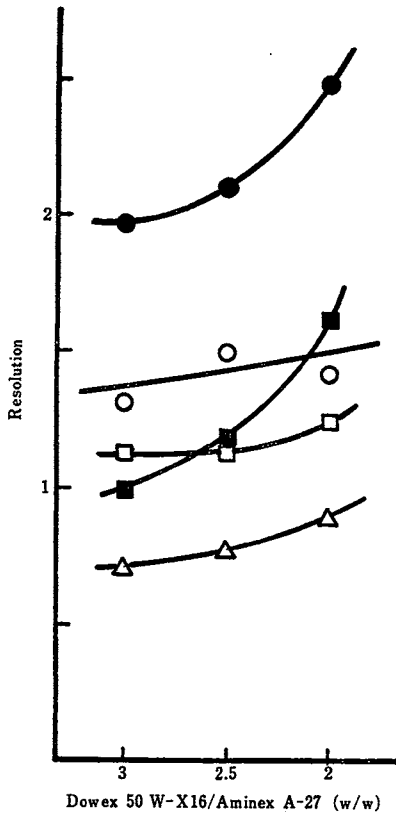


Fig. 1 Effect of weight ratio of Dowex to Aminex on resolution of some adjacent anions

●: F⁻ (5 ppm)-Cl⁻ (10 ppm); ○: NO₂⁻ (30)-HPO₄²⁻ (30); ■: HPO₄²⁻ (30)-Br⁻ (30); △: Br⁻ (30)-NO₃⁻ (30); □: Cl⁻ (10)-NO₂⁻ (30); Sample volume injected: 100 μl; IC conditions other than the mixing ratio are given in Table 1.

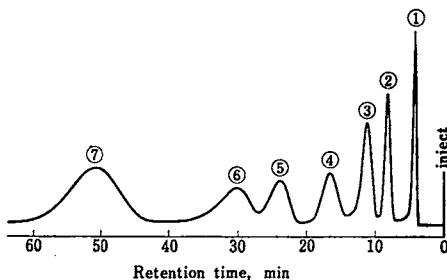


Fig. 2 Typical chromatogram for a mixture of 7 anions

Chromatographed under the conditions given in Table 1; Sample injected: 100 μl of the mixture; ① F⁻ (5 ppm), ② Cl⁻ (10), ③ NO₂⁻ (30), ④ HPO₄²⁻ (30), ⑤ Br⁻ (30), ⑥ NO₃⁻ (30), ⑦ SO₄²⁻ (45)

グラムを Fig. 2 に示した。電導度計のフルスケール 15 μmho の条件で F⁻ (4 ppm まで), Cl⁻ (10 ppm まで), その他の陰イオン (60 ppm まで) について作成した検量線は原点を通る良好な直線性を示した。

3.1.5 分離カラムの安定性 最適分離条件で同一分離カラムを繰り返して、不連続に長時間使用したときの分離カラムの安定性を各試料の保持時間とそのピーク高さの再現性の観点から検討した。結果を Fig. 3 に示した。保持時間は試料の注入回数、測定日、使用時間の長さによらず一定であった。HPO₄²⁻, NO₃⁻, Br⁻, SO₄²⁻ など比較的ブロードなピークの高さはほぼ一定しているが、F⁻, Cl⁻ など鋭敏なピークの高さ(特に測定日の異なる場合)は再現性が幾分劣る。NO₂⁻ のピークははだいに高くなる傾向が認められる。しかし種々の濃度の 7 種の陰イオンを混合して作成した検量線はほぼ直線を示した。

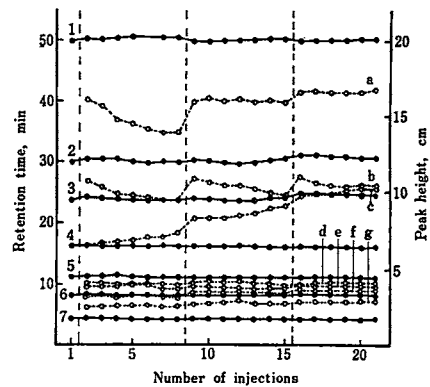


Fig. 3 Number of injections vs. retention time and peak height

●: Retention time; ○: Peak height; 1: SO₄²⁻; 2: NO₃⁻; 3: Br⁻; 4: HPO₄²⁻; 5: NO₂⁻; 6: Cl⁻; 7: F⁻; a: F⁻; b: Cl⁻; c: NO₂⁻; d: SO₄²⁻; e: HPO₄²⁻; f: Br⁻; g: NO₃⁻; IC conditions are given in Table 1; Measured on different days (indicated by dotted vertical lines in the Figure); Full scale setting: 15 μmho; Sample volume injected: 100 μl

3.2 一価陽イオンの分離

3.2.1 分離条件の検討 Aminex に対する Dowex の混合重量比 1:3, 1:2.5, 1:2.2, 1:2 の各条件について分離度を調べた。陰イオンの分離の際に観測されたように Dowex に対する Aminex の付加量が増えるほど分離はよい。

カラム長さは (7, 13, 15) cm の 3 段階に変えて、そのときの分離度を調べた。7 cm のカラムでは NH₄⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ の分離はできなかった。13 cm のカラムでは

NH_4^+ - K^+ , K^+ - Rb^+ の分離度は 0.8~0.9 であったがその他の成分の分離は良好であった。カラム長さ 15 cm では、溶離に長時間を要するが、調べた 6 種の陽イオンの分離は満足できるものであった。

溶離液として用いる塩酸の濃度を 5 mM と 10 mM の 2 段階に変えて分離に及ぼす影響を調べた。10 mM 塩酸の条件では各試料の保持時間は 5 mM 塩酸の場合の約半分に短縮されるが分離能は全般的に劣る。

3.2.2 最適分離条件 最適分離条件を Table 1 に、この条件で得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示した。又この条件で作成した検量線は NH_4^+ を除いてほぼ直線性を示した。 NH_4^+ は調べた濃度 (30 ppm まで) 範囲で全般的に湾曲したが、これは除去カラム内で NH_3 への解離が起これ電導度が NH_4^+ の濃度に比例せず低下するためである。

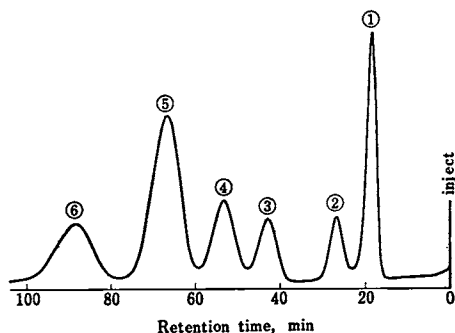


Fig. 4 Typical chromatogram for a mixture of 6 cations

Chromatographed under the conditions given in Table 1; Sample injected: 100 μl of the mixture; ① Li^+ (3 ppm), ② Na^+ (5), ③ NH_4^+ (10), ④ K^+ (20), ⑤ Rb^+ (80), ⑥ Cs^+ (100)

3.2.3 分離カラムの安定性 3.1.5 と同様の観点から分離カラムの安定性を検討した。結果を Fig. 5 に示した。陽イオンの分離に用いた定流量ポンプは陰イオンの分離に用いたものに比べ性能が劣り、流速に 10% 程度の変動が見られたので、保持時間の代わりに保持容量を指標とした。同一分離カラムを繰り返して、不連続に長時間 (ここでは 12 時間) 使用しても保持容量は Cs^+ を除いてほぼ一定値を示したがピーク高さ (特に Li^+) には変動が認められた。

3.3 二価陽イオンの分離

二価陽イオン相互の分離に二塩酸 *m*-フェニレンジアミンを溶離液として用いることの有効性が論じられてい

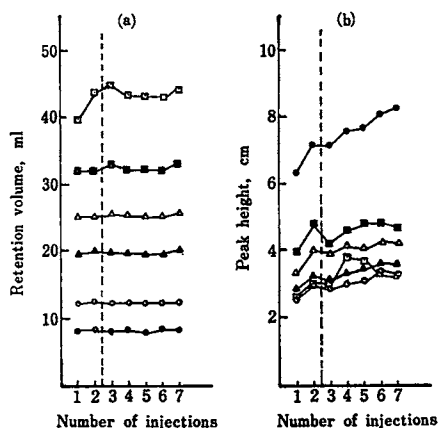


Fig. 5 Number of injections vs. retention volume and peak height

(a): Retention volume; (b): Peak height; ●: Li^+ ; ○: Na^+ ; ▲: NH_4^+ ; △: K^+ ; ■: Rb^+ ; □: Cs^+ ; IC conditions are given in Table 1. Measured on different days (indicated by dotted vertical line in the Figure). Full scale setting: 15 μmho ; Sample volume injected: 100 μl

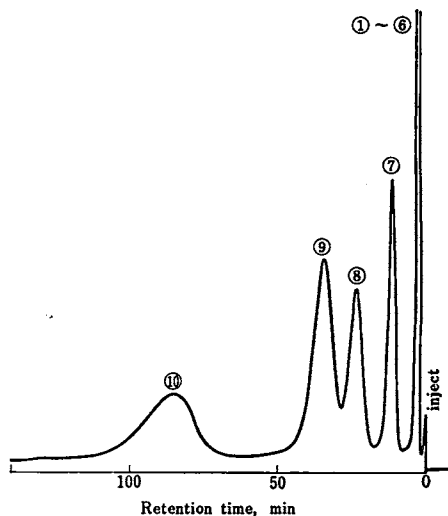


Fig. 6 Typical chromatogram for a mixture of 6 monovalent and 4 divalent cations

Chromatographed under the conditions given in Table 1; Sample injected: 100 μl of the mixture; ① Li^+ (3 ppm), ② Na^+ (5), ③ NH_4^+ (10), ④ K^+ (20), ⑤ Rb^+ (80), ⑥ Cs^+ (100), ⑦ Mg^{2+} (5), ⑧ Ca^{2+} (10), ⑨ Sr^{2+} (25), ⑩ Ba^{2+} (50)

る。そこで、6 種の一価陽イオン及び 4 種の二価陽イオンの混合試料を Table 1 に挙げた条件で分離することを試みた。得られたクロマトグラムを Fig. 6 に示す。

二塩酸 *m*-フェニレンジアミンは二価陽イオン相互の分離に有効であることが分かる。この溶離液は、光に不安定で、樹脂に吸着しカラム寿命を短くすると指摘されている²⁾。本実験でも分離カラム内の混合樹脂相は溶離液の流入側からしだいに变色し、溶離を繰り返す間に、混合樹脂相全体がだいたい色となり二塩酸 *m*-フェニレンジアミンが Dowex 樹脂と Aminex 交換体の両方に吸着されるのが認められた。しかし、混合樹脂相の变色の進行中及び变色後の二価陽イオンの分離性、ピーク位置及びピーク高さには再現性があった。試料の分析に要する使用回数(検量線作成のための回数を含め 10 回程度)内では、カラムその他の IC 系を遮光しなくても、再現性に特別の問題はなかった。しかし二塩酸 *m*-フェニレンジアミンを溶離液として二価陽イオンを分離した後では、分離カラムに 5mM 塩酸を十分に流しても、同じ分離カラムで一価陽イオン相互の分離はできなかった。

4 考 察

Aminex 交換体を Dowex 交換樹脂と水中でかくはんしながら調製した混合樹脂は IC 用分離カラムとしてほぼ満足できる機能を発揮することが分かった。Aminex は Dowex に安定に保持され、10 時間以上の使用に十分耐える。混合樹脂の顕微鏡写真では Dowex 樹脂の表面に Aminex 交換体が保持されている様子しか認められなかったが、混合樹脂の構造は、その形状がかさばった海綿状を呈することから判断して、Aminex が Dowex どうしを橋渡しして互いに結びつけた凝集体を形成しているものと考えられる。本研究で用いた分離カラムの樹脂床容量は 0.2 ml 程度で極めて小さいにもかかわらず溶離に長時間を要するのは混合樹脂凝集体内部への試料イオンの拡散に原因があると思われる。

混合樹脂を詰めた分離カラム内の樹脂床が占める体積は初めに 30 分程度溶離液を流す間に約 10% 収縮し、その後長時間にわたって使用するうちに更に収縮しそれに伴って溶離圧が増す。収縮の程度は Dowex 樹脂の架橋度に関係している。陰イオンの分離では、X 16 の樹脂を用い、長時間使用後 20% 程度の収縮が生じた。陽イオンの分離では、X 16 の樹脂が市販されていなかったため X 8 のものを用い、長時間使用後 30% 程度の収縮が生じた。本論文で記したカラム長さはすべて充てん時のものである。収縮の大きいカラムに高流速で溶離液を流すとカラムにかかる圧力が急激に増加しテフロンチューブが破損することがある(チューブの一部に小さな膨らみが生じそこにあながあくもので物理的危険性は

ない)。

混合樹脂に用いる Dowex 樹脂の粒度が(100~200)メッシュのものでは Aminex の吸着性が悪く分離カラムとしては用いられなかった。

市販の Aminex 交換体をそのまま用いても Dowex 樹脂に吸着させることができるが、ときには長時間かくはんしても吸着・混合樹脂が得られないことがある。このような場合、Aminex 交換体を再生処理するとよい。例えば、Aminex A-5 の場合、ガラスフィルター上で、塩酸溶液(2M 程度)、次に塩化ナトリウム溶液(2M 程度)で処理し、最後に純水で洗浄する。

IC 分離カラム用樹脂として最も重要な要件である低交換容量の交換体を合成する試みは Small らによる IC 法の導入以来活発に行われている³⁾。本研究の進行中にも、15 μ m の Dowex 50 W-X 35 の陽イオン交換樹脂に合成した陰イオン交換樹脂のラテックスを付着させて陰イオン交換体を調製する方法が報告された⁴⁾。本論文で述べた混合樹脂の調製法は今までに報告されたものに比べ簡便である。テフロン製四方バルブインジェクターを利用することにより、分離カラムを一度に数本作製でき、しかも分離カラムに充てんする樹脂量は極めて少なく、使い捨てにしても経済的負担は軽い。このことは、二塩酸 *m*-フェニレンジアミンのような、樹脂に強く吸着し以後の一価陽イオンの分離を困難にする溶離液を用いる際に特に有用である。

本研究で得られた陰イオン及び陽イオンの分離性は溶離に長時間を要するという欠点はあるが、日常分析を目的としない者が IC の手法を利用して研究を進めるうえで有効である。

文 献

- 1) H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman: *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 2) 及川紀久雄: ぶんせき, **1980**, 531.
- 3) D. T. Gjerde, J. S. Fritz: *J. Chromatogr.*, **176**, 199 (1979).
- 4) D. T. Gjerde, J. S. Fritz, G. Schmuckler: *J. Chromatogr.*, **186**, 509 (1979).
- 5) T. S. Stevens, M. A. Langhorst: *Anal. Chem.*, **54**, 950 (1982).

☆

A simple preparation of separation columns for ion chromatography. Isao SANEMASA, Takemi MIZOGUCHI, Junko OHTSUKA, Toshio DEGUCHI, and Hideo NAGAI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto)

Mixed resins are prepared to make anion- and cation- separation columns for ion chromatography. The optimum conditions have been studied. Aminex®

and Dowex® are mixed in the weight ratio of 1 : 2 in pure water with stirring. The mixed resins thus prepared are packed in Teflon® tubes (1 mm i. d., 3 mm o. d.) and are used as separation columns. For the separation of anions, Aminex A-27 (13.5 μm)-Dowex 50W-X16 {(200~400) mesh} is used. On a 20 cm column, seven anions (F^- , Cl^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , Br^- , NO_3^- , and SO_4^{2-} , in the mixture) can be separated in 60 min with 1.0 mM NaHCO_3 - 2.0 mM Na_2CO_3 eluent at a flow rate of 1 ml min^{-1} . For the separation of cations, Aminex A-5 (13 μm)-Dowex 1-X8 {(200~400) mesh} is used. On a column of 13 cm to 15 cm, six monovalent cations (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , and Cs^+ , in mixture) can be separated in 100 min with 5 mM HCl eluent at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} . A mixture of six monovalent (from Li^+ to Cs^+) and four divalent (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , and Ba^{2+}) cations

can be separated with 1.25 mM *m*-phenylenediamine dihydrochloride-1.25 mM HCl eluent, that is, a single peak corresponding to monovalent cations followed by four peaks of divalent cations (on a 13 cm column Ba^{2+} ions are eluted in 110 min at a flow rate of 0.5 ml min^{-1}). The elution times are longer compared to those for the commercially available columns, but the separation profiles of both cations and anions are satisfactory.

(Received Jan. 14, 1983)

Keyword phrases

preparation of separation columns for ion chromatography; separation of anions by ion chromatography; separation of cations by ion chromatography.