

# 環境水中の微量イオン種定量のための分析法 (3)

— 亜硫酸イオンの定量における液体クロマトグラフ蛍光検出法と  
イオンクロマトグラフィー法の比較検討 —

蒲生 啓司・清本 若草・川崎 亜由美・松島 秋子・澤本 博道  
(教育学部化学教室)

Analytical Methods for the Determination of Trace Ion Species in Environmental Water (Part 3); Instrumental Comparison in Determination Methods for Sulfite Ion by Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection and Ion Chromatography

Keiji GAMOH, Wakakusa KIYOMOTO, Ayumi KAWASAKI,  
Akiko MATSUSHIMA and Hiromichi SAWAMOTO  
*Laboratory of Chemistry, Faculty of Education*

**Abstract:** Instrumental comparison in methods for the determination of sulfite ion by liquid chromatography with fluorimetric detection and ion chromatography with conductive detection was described. In the liquid chromatographic method the sulfite ion was first coupled with *o*-phthalaldehyde, followed by reacting with glycine to produce fluorogenic compound. The fluorogenic compound was detected at 395 nm when was exited at 330 nm. Many kinds of conditional factors for the two serial reactions were investigated to obtain the optimum analytical conditions. The linear response range in the relatively low concentration of sulfite ion was observed at 0.01~8.0 ppm. In the ion chromatographic method, which was consisted of the suppressor column type, the sulfite ion was separated by an anion exchange column and determined by direct conductive detection. The linear response range in the low concentration of sulfite ion was observed at 0.80~160 ppm. A good correlation between the liquid chromatographic and ion chromatographic determination of sulfite ion at the range of 0.80~160 ppm of sulfite ion was observed in the direct instrumental comparison. However, at the lowest range of sulfite ion, 0.01~0.70 ppm, the correlation was not always good. The present analytical methods were applied to the determination of sulfite ion in wine.

キーワード：環境化学、微量分析、亜硫酸イオン、高速液体クロマトグラフィー、  
蛍光検出、イオンクロマトグラフィー

## 緒 言

近年、各種産業の目覚ましい発展と共に、その一方で産業廃棄物が自然水あるいは水道水の中に

混入または溶解し、汚染は深刻化を増している。酸性降下物、とりわけ酸性雨<sup>1)</sup>においては、地球規模で降雨しており、湖沼や森林などの生態系、遺跡等の建造物などに大きな影響を及ぼしていることが、内外の研究者によって指摘されている。このように、我々の回りを取り巻く環境の中で、水の占める役割は非常に大きい。我が国でも、「水質汚濁防止法」<sup>2)</sup>に基づいて、水質自動監視測定装置を全国169カ所(平成5年度現在)に設置し<sup>3)</sup>、水質改善に向けての積極的な取り組みが行われている。従って、水質汚染の深刻化の原因究明及び改善のためにも、水質の現状を把握することは第一義的に重要である。そうした目的に沿って、環境水中の微量成分を精度よく、かつ高感度で定量するための方法の開発が求められている。

前報までは、環境水中の微量イオン種定量のための分析法の一環として、測定法(測定機器)による定量値の誤差、あるいは相関性を観察する目的から、亜硝酸イオン及びリン酸イオンの定量における吸光光度法とイオンクロマトグラフィー法との比較検討を行った結果について報告してきた<sup>4), 5)</sup>。即ち、亜硝酸イオン及びリン酸イオンにおいて、吸光光度法における誘導体化反応と検出の選択性、及びイオンクロマトグラフィー法における分離と検出の選択性が利用されたわけであり、いずれも再現性のよい結果を得ることができ両者の相関も非常に高かった。

今回は、環境中の微量イオンとして、亜硫酸イオンについて注目した。二酸化硫黄を溶かして得られる亜硫酸は弱酸で、溶液中では不安定であるため、亜硫酸イオン $\text{SO}_3^{2-}$ としての存在は微量で、この溶液を煮沸したり気体を通じると二酸化硫黄は逃げて $\text{SO}_3^{2-}$ は消失する。このように、亜硫酸イオンは環境中で $\text{SO}_3^{2-}$ の形での存在は低く、様々な形に変化して $\text{SO}_3^{2-}$ としての形態を失う。このような形態の変化の一例として、次のようなものが挙げられる。亜硫酸イオン $\text{SO}_3^{2-}$ は、 $\text{H}^+$ を結合して、ごく弱酸である $\text{HSO}_3^-$ を経て、中程度の強さの酸でかなりの還元性のある亜硫酸分子 $\text{H}_2\text{SO}_3$ となる<sup>6)</sup>。また、電子を与えて硫酸イオンになろうとする傾向が強く、酸性雨の主成分である硫酸にまでその形態を変化させてしまう。このような、形態の変化は、自然界においても繰り返されていることではあるが、 $\text{SO}_3^{2-}$ としての環境中の存在量は極めて低いとされている。また、近年においては、ワイン、缶詰といった身近な食品に漂白殺菌剤、あるいは酸化防止剤等、食品添加物として亜硫酸塩が使用されており、直接的に私達人間への影響も懸念されている。

亜硫酸イオンの分析法には、主として質量法、容量法、比色法及びイオンクロマトグラフィー法などがある。イオンクロマトグラフィー法は、1975年 Small ら<sup>7)</sup>によって陰イオンを短時間で分離する方法として初めて報告され、高速液体クロマトグラフィーの原理を適用するとともに、分離済みの陰イオンを電気伝導度法で検出できるように、イオン交換カラムを組み合わせることで確立された。この方法は、大気や水質といった環境試料中のイオンの分析に広く用いられており、環境問題の解明にも役立ってきた。しかし、亜硫酸イオンにおいては酸化反応を受けやすいイオンであるから、従来のイオンクロマトグラフィー用電気伝導度検出器では、感度が不足するため、困難な分析とされている。

微量イオン種の定量や定性の際、分離部と検出部が非常に重要であり、できるだけ多くの情報を取得するためには、有効な検出器を選択しなければならない。本実験では、亜硫酸イオンがオーフタルアルデヒド(OPA)及びグリニンと反応することによって、発蛍光性物質に誘導されることに注目し、高感度かつより選択性の高い蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、 $\text{SO}_3^{2-}$ を蛍光検出し定量することを検討した。

本研究では、上記の反応の最適条件を見出すとともに、蛍光検出による亜硫酸イオンの低濃度域での定量性及び検出下限と、イオンクロマトグラフィー法との定量性の直接比較について報告する。

## 実験方法

## 1. 測定原理及び方法

本蛍光検出法における亜硫酸イオン定量のための測定原理としては、チオール化合物が OPA、及びグリシンと反応することにより、発蛍光性物質を生成する反応機構<sup>8)</sup>に従って、Fig.1 に示した。即ち、亜硫酸イオンが OPA、及びグリシンと反応することによって蛍光性のイソインドール誘導体を生成する反応に基づいている。

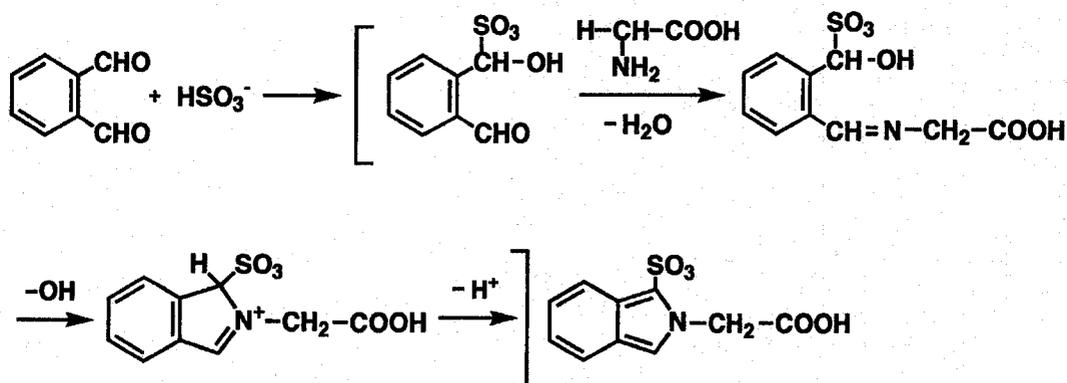


Fig. 1. Reaction scheme of sulfite ion with *o*-phthalaldehyde and glycine.

実験の手順として、亜硫酸イオンの標準溶液、または亜硫酸イオンを含む分析試料をサンプル管に入れ、OPA、グリシンの順に加え、反応させた直後の試料を蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフに注入し、得られるクロマトグラムから目的のピーク面積を算出し、検量線を作成する。その際、本法における最適化を図るために以下の諸条件を検討した。その項目としては、1) 蛍光スペクトルによる励起及び蛍光波長の設定 2) 移動相中のアセトニトリル濃度の検討 3) 移動相の pH の影響 4) OPA 反応量 5) グリシン反応量である。これらの検討結果から最適条件を求め、その条件下で種々の濃度に調整した亜硫酸イオンを用いて検量線を作成した。また、実試料としてワインを用いて亜硫酸イオンの検出を試みた。

条件検討として使用した亜硫酸イオン水溶液の濃度は、 $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$  (800 ppm) とした。また、OPA は、エタノールに溶解して濃度を 2.0mM に、グリシンは、ホウ酸が 0.2M、ホウ砂が 0.1M、及び炭酸ナトリウムが 0.2M と、それぞれなるように、水で調製されたホウ酸-炭酸緩衝溶液に溶解し、濃度を 2.0mM に調製したものを使用した。

イオンクロマトグラフィー法においては、サブプレッサー方式とノンサブプレッサー方式<sup>9)</sup>があるが、本実験では検出感度の高いサブプレッサー方式により、種々の濃度に調製した亜硫酸イオン水溶液を、一定量カラムに注入して得られたクロマトグラムのピーク高さより、検量線を作成した。

## 2. 測定機器及び測定条件

本研究で用いた測定機種は、分光蛍光光度計(島津製作所製 RF-540)、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(島津製作所製、蛍光検出器 RF-535、送液ポンプ LC-6A、データ処理装置クロマトパック C-R4A から成る)、及びイオンクロマトグラフ(横河製 MODEL IC 100、陽イオン交換膜チューブ型サブレッサ、データ処理装置 MODEL 3021 PEN RECORDER から成る)である。高速液体クロマトグラフィーでは、分離カラムとして、旭化成工業製 ODP-50 (4.6mm i.d. × 150mm)、移動相として、20mM リン酸水素二カリウム/リン酸二水素カリウム水溶液とアセトニトリルの混合液を用い、流速 0.7ml/min で分析を行なった。また、イオンクロマトグラフィーでは、分離カラムとして横河製 SAX1-251 (4.6mm i.d. × 250mm)、プレカラムとして、横河製 PA X1-051 (4.6 mm i.d. × 50mm) を、移動相として、4mM 炭酸ナトリウム水溶液と 4mM 炭酸水素ナトリウム水溶液の混合液を、除去液として、50mM ドデシルベンゼンスルホン酸を用いて、流速 1.0ml/min、カラム温度 40°C で分析を行なった。

## 結果及び考察

### 1. 蛍光スペクトルによる励起及び蛍光波長の設定

亜硫酸イオンは、OPA、グリシンと反応して発蛍光体を生成する。その発蛍光体を蒸留水で50倍に希釈したものの蛍光スペクトルを測定したところ、Fig.2 に示すように 励起極大は 330nm

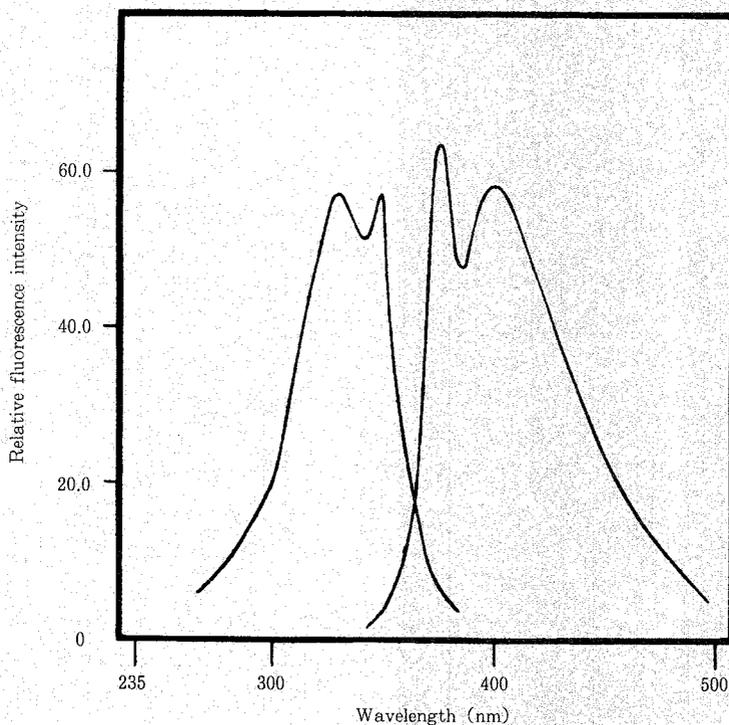


Fig. 2. Excitation and emission spectra of the isoindole derivative.

に、蛍光極大は395nmに認められた。なお、蛍光スペクトル363nm、励起スペクトル344nm付近に見られるスペクトルは、蒸留水だけによる測定の際も認められたため、これは、蒸留水のラマン効果によって散乱されてくる光のスペクトルであると考えられる。以後、励起波長330nm、蛍光波長395nmで測定を行うことにした。また蒸留水で125倍希釈した発蛍光体の反応直後(a)、反応させてから30分後(b)、60分後(c)のスペクトル(Fig.3)に示すように、時間の経過に従って、発蛍光体の蛍光強度が若干ながら減少することが認められたため、極力反応直後の発蛍光体を分析に用いることにした。

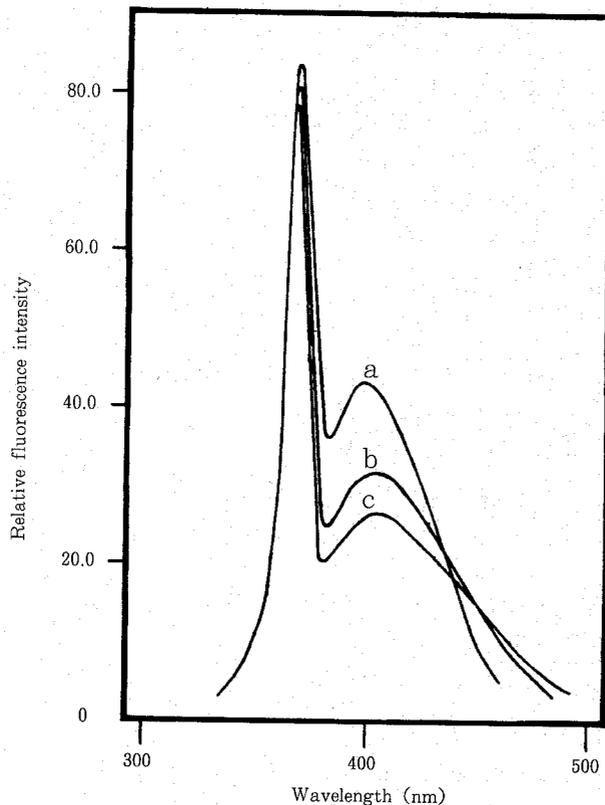


Fig. 3. Effect of the standing time on the fluorogenic reaction.

## 2. 移動相中のアセトニトリル濃度の検討

アセトニトリルを溶離液として用い、アセトニトリルと20mMリン酸緩衝溶液の組成比を変え、その影響を調べた。この結果、アセトニトリルが高濃度域では、溶出力が強いため発蛍光体はカラム内に保持されず、濃度を下げるに従ってカラム内に徐々に保持されるようになった。また、アセトニトリル濃度10%以降は、保持時間に差が見られなかったため、濃度を10%とした。

### 3. 移動相のPHの影響

20mM リン酸水素二カリウム/リン酸二水素カリウム水溶液を用いて種々のpHに調製した溶離液を作製し、発蛍光体の蛍光強度と分離に及ぼすpHの影響を調べた。pH3.2、6.2、8.0の各移動相で分析した発蛍光体のクロマトグラムをFig.4に示した。pHが酸性の溶離液では、ピークが複数に分かれ目的のピークの確認ができなかった。これに対しアルカリ性の溶離液では目的のピークが一つとなった。また、アルカリ性に近づくにつれて蛍光強度が増していくこと、アルカリ性の移動相中で時間の経過による蛍光強度の減少が酸性に比べ小さいことも認められた。以上より、この発蛍光体はアルカリ性の溶離液中で安定であると考えられる。以後、移動相のpHをアルカリ側(pH=8.0)に調製して実験を行なった。

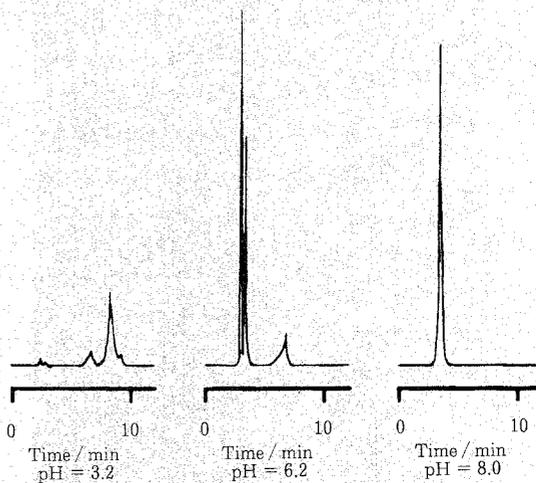


Fig. 4. Effect of pH in the mobile phase.

### 4. OPA反応量

反応させる亜硫酸イオン水溶液及びグリシンの量を共に100 $\mu$ lに固定し、OPAの量を変えて反応させ、最適のOPAの反応量を検討した。

Fig.5に示したように、OPA 100 $\mu$ lの量で反応させ得られた発蛍光体のピークの面積が最大となった。以後、亜硫酸イオン水溶液と同量のOPAを反応に用いることにした。

### 5. グリシン反応量

OPA反応量の結果に基づき、反応させる亜硫酸イオン水溶液及びOPAの量を共に100 $\mu$ lに固定し、グリシンの量を変えて反応させ最適のグリシンの反応量を検討した。

Fig.6に示したように、グリシン150 $\mu$ lの量で反応させ得られた発蛍光体のピークの面積が

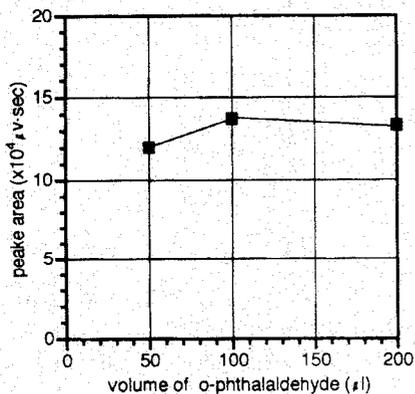


Fig. 5. Effect of concentration of o-phthalaldehyde.

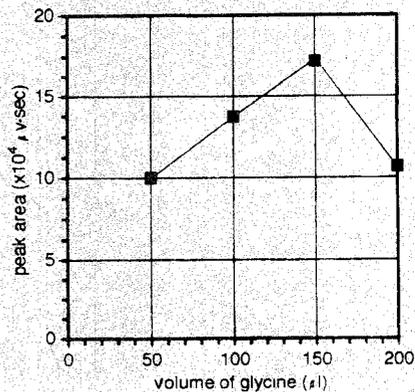


Fig. 6. Effect of concentration of glycine.

最大となった。以後、亜硫酸イオン、OPA の量に対して反応に用いるグリシンの量を1.5倍とした。

## 6. 検量線

以上の検討結果により、最適化された条件下での亜硫酸イオン 0.8 ppm のクロマトグラムを Fig.7 に示した。更に、亜硫酸イオンの定量範囲を求めるため検量線を作成した。検量線は、亜硫酸イオンの濃度範囲を  $5.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  M として Fig.8 に示した。この濃度範囲で直線性の良好な検量線が得られた (相関係数=0.99)。検出限界濃度は、 $1.25 \times 10^{-7}$  M、すなわち 0.01 ppm (S/N=3) とした。

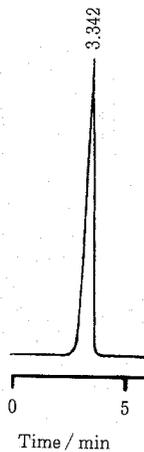


Fig. 7. Chromatogram of standard sulfite ion by liquid chromatography with fluorimetric detection (0.8 ppm).

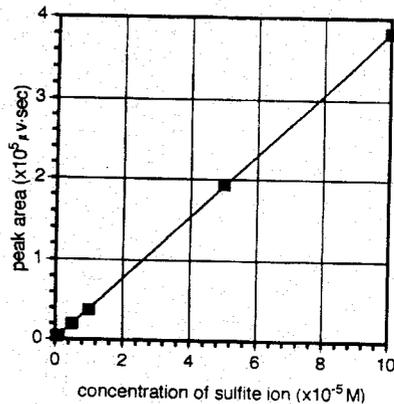


Fig. 8. Linearity of sulfite ion by liquid chromatography with fluorimetric detection.

## 7. イオンクロマトグラフィー法

上記の蛍光分析法に使用した同一の亜硫酸イオン試料を用いて、イオンクロマトグラフィー法によって得られる亜硫酸イオン濃度とピークの高さの結果から、検量線を作成した。亜硫酸イオン 1.0 ppm のイオンクロマトグラムを Fig.9 に示した。また、検量線は亜硫酸イオンの濃度範囲を  $1.0 \times 10^{-5} \sim 2.0 \times 10^{-3}$  M として Fig.10 に示した。この濃度範囲で直線性の良好な検量線が得られた (相関係数=0.99)。検出限界濃度は  $1.0 \times 10^{-5}$  M、すなわち 0.8 ppm とした。通常、イオンクロマトグラフィー法において定量される陰イオンの検出下限に比べて、亜硫酸イオンのそれは、はるかに高い値を示した。この理由は、イオンクロマト分析に関わる一般の問題として、例えば注入された亜硫酸イオンがすべて検出されているかという疑問が生じてくるが、特に亜硫酸イオンの場合には、検出器に入るまでに移動相中で酸化され、その形態を変えることが検出下限の高値に関わってくるものと考えられる。

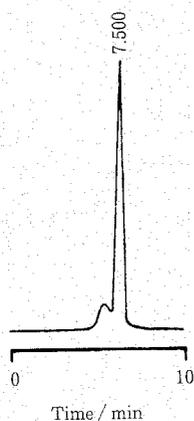


Fig. 9. Chromatogram of standard sulfite ion by ion chromatography (1 ppm).

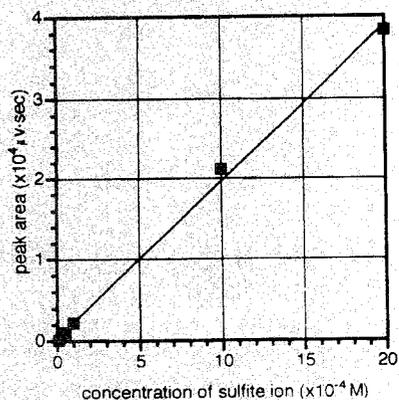


Fig. 10. Linearity of sulfite ion by ion chromatographic detection.

## 8. 実試料の分析

これまで述べてきたように亜硫酸イオンは、 $\text{SO}_3^{2-}$ としての天然存在量は極めて低く、また、その形態は変化しやすいために、河川水や雨水といった天然水中に存在する亜硫酸イオンを定量するには、サンプルの捕収方法、サンプリングから測定に至るまでの時間等が問題となってくる。そこで今回、実試料として、サンプリングの必要がない市販のワインを選び、上述の二つの方法に従って分析を試みた。

試料は、市販の白ワインを用いた。ワインの原液を50倍希釈したものを、上記の最適条件下で反応させ、蛍光検出法により測定したクロマトグラムを Fig.11 (a) に、ワインの原液100倍希釈のイオンクロマトグラムを Fig.11 (b) に示した。その結果、蛍光検出法からは、約80 ppm の亜硫酸イオンを、一方、イオン



Fig. 11. Chromatogram of sulfite ion in wine by liquid chromatography with fluorimetric detection (a), and ion chromatography (b).

クロマトグラフィー法では、約 26.5 ppm の亜硫酸イオンを検出した。測定法の違いによって、定量値の大幅な誤差が観察された。この結果から、標準試料に基づく定量性が、実試料測定段階でどのように崩されていくか、あるいは試料中の亜硫酸の形態がどのようになっているか、という課題がクローズアップされた。どちらが正しい定量値を示しているかの判断は現段階では難しい。ここでは、河川水や雨水等天然に存在する亜硫酸イオン定量の方法と共に、試料の前処理等も含めて、今後の検討内容としておきたい。

## 結 語

本研究では、亜硫酸イオンを発蛍光物質に誘導体化して、HPLCで検出する際の最適条件を見出すことを大きな目的として進めてきたが、その過程でいくつかの問題点に直面した。その中でも、HPLCの移動相のpHは、亜硫酸イオンの分析結果を大きく左右することが明らかとなった。即ち、亜硫酸イオンから誘導される発蛍光体が、アルカリ性側では比較的安定であり、検出条件に適していることが確認された。今回用いたHPLC-蛍光検出法において亜硫酸イオンを定量する際に、誘導体化された発蛍光体の蛍光強度を減少させることなく、アルカリ側で如何に安定させて定量を行うかが重要となってくる。

今回、蛍光検出法とイオンクロマトグラフィー法の二つの分析方法を採用したことにより、同一試料の直接比較を行うことができた。その結果、従来亜硫酸イオンを定量する方法の一つとされてきたイオンクロマトグラフィー法に比べ、蛍光検出法は約80倍の検出感度をもつことが確認できた。即ち、蛍光検出法により低濃度域での定量が可能になることによって、環境水などの実試料の測定に有効な方法として実用化されると考えられる。更に、今後の実用化を考えるにあたっては、サンプリングからデータ処理に至るまでの分析システムの自動化などを実現させる必要があるのではないかとと思われる。蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーは、常時移動相の流れの中で分析が行われるため、測定の際は、試料の注入のみが必要な作業となる。従って、オートインジェクタなどを使用することによって、連続分析が可能になると思われる<sup>10)</sup>。しかし、先に述べたように亜硫酸イオンから誘導される発蛍光体は、時間の経過とともに蛍光強度が減少してしまうということを考慮しなくてはならない。このために、反応に用いる試薬を連続的に加えるシステム、即ち、フローインジェクションシステム等も合わせて構築することができれば、測定の自動化が可能になるのではないかと考えられる。

## 謝 辞

本研究を推進するにあたり、研究費の一部は、平成5年度特定研究経費によった。ここに感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) 大木道則訳、アメリカ化学会編：ケムコム-社会に生きる化学-，442p.，東京化学同人（1993）。
- 2) 環境庁水質保全局編：産業と環境，17（5），81（1988）。
- 3) 環境庁編：環境白書各論，317p.，大蔵省印刷局，（1994）。
- 4) 蒲生啓司・澤本博道：高知大学学術研究報告，41，17（1992）。
- 5) 蒲生啓司・澤本博道：高知大学学術研究報告，42，26（1993）。
- 6) 日本化学会編：化学総説（No.10）大気の化学，106p. 学会出版センター（1990）。
- 7) H. Small, T. S. Stevens and W. C. Bauman, *Anal. Chem.*, **47**, 1801（1975）。
- 8) 波多野博行・花井俊彦：実験高速液体クロマトグラフィー，179p.，化学同人（1988）。
- 9) 土屋正彦・戸田昭三・原口紘无監訳，Gary D. Christian：分析化学Ⅱ-機器分析-，220p.，丸善株式会社（1989）。
- 10) K. Gamoh and T. Yagi, *Anal. Sci.*, **4**, 433（1988）。

平成6（1994）年9月28日受理

平成6（1994）年12月26日発行

