

versity School of Medicine, 86, Nishimachi, Yonago-shi, Tottori)

A simple and rapid method was investigated for the determination of ppb levels of cadmium and copper in water, by a dual channel atomic absorption spectrophotometry with electrothermal atomization. The optimum operating conditions on the simultaneous determination were as follows: drying at *ca.* 180°C for 30 s, ashing at *ca.* 470°C for 60 s, atomization at *ca.* 2700°C for 10 s, and argon flow rate of 3 l/min. Sample solutions were acidified with nitric acid, because both cadmium and copper signals became maximal and constant over the range of 0.1 to 0.5 N in nitric acid and the addition of nitric acid was effective to decrease the non-specific absorption caused by sodium or potassium chloride. For sample volumes of 20 μ l, the calibration graphs were linear up to 2.5 ppb for cadmium and up to 250 ppb for copper. The relative standard deviations of 2.4% and 1.4%, respectively, were obtained at the analytical levels of 2.0 ppb for cadmium and 200 ppb

for copper. On the determination of cadmium, the permissible amounts of some diverse ions, such as K^+ and Pb^{2+} , increased greatly by making use of the peak-area instead of the peak-height as a measure of absorbance. This method was applied to the analysis of river and waste water, and the results were in good agreement with those obtained by the background correction method.

(Received Mar. 13, 1978)

Keywords

Atomic absorption spectrophotometry

Cadmium

Copper

Graphite furnace atomizer

Simultaneous determination

Water

高速液体クロマトグラフィー用高粘度スラリー充てん法

野村 明, 森田弥左衛門, 小暮 幸全*

(1978 年 3 月 6 日受理)

高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略記) における高粘性溶媒を用いるスラリー充てん法について検討した. 球形シリカゲルを用いる吸着クロマトグラフィー用カラムは流動パラフィン-*n*-ヘキサン系溶媒を, ODS-シリカゲルを用いる逆相クロマトグラフィー用カラムはグリセリン-エタノール系溶媒を使用して充てん圧, スラリー溶媒の粘度, 充てん流速などの影響について検討した. その結果, 高粘性溶媒による高圧充てん法で効率の良いカラムが得られることが判明した. 又, 本法を粒径の異なる球形シリカゲルの充てんに応用し, 平衡スラリー法とカラム効率を比較した結果, ほぼ同程度の効率を得られることが認められた.

1 緒 言

最近の HPLC の発展は, 機器及び充てん剤の改良に負う所が大であるが, カラム充てん法により, 得られるカラムの効率は非常に影響される. 乾式充てん法は主に粒径の大きな充てん剤 ($>50 \mu m$: 破碎型¹⁾²⁾, $>30 \mu m$: 球形³⁾, $>(20\sim37) \mu m$: 大口径カラム⁴⁾) の充てんに用いられていたが, 充てん剤の粒径が小さくなるに伴い, 最近はほとんどすべて, スラリー充てん法が用いら

れている. その方法は多種多様であり, スラリー溶媒の種類により, 平衡スラリー法^{5)~9)}, 非平衡スラリー法^{10)~19)}, 高粘度スラリー法²⁰⁾, 充てん方法の相違により, ダイナミックスラリー法¹⁷⁾²¹⁾²²⁾, 上方スラリー法¹⁷⁾²³⁾, などに分類が可能ではあるが, いずれの方法においても, 高圧 $\{(140\sim700) \text{ kg/cm}^2\}$ で充てんすることにより, 効率の良いカラムが得られる点は一致している. これまでの充てん法の研究より, 高効率の分離能の高いカラムとは, 充てん剤が, カラムの縦方向及び横方向に粒径分布を持たず, 均一にしかも密に充てんされたカラムといえる. 粒径の相違によるカラムの縦方向の粒

* 工業技術院東京工業試験所: 東京都渋谷区本町 1-1-5

径分布をなくす方法としては, 平衡スラリー法が原理的には最適であるが, シリカ系の充てん剤の場合には, スラリー溶媒の比重を高める目的で, テトラブロモエタンなどの高比重の溶媒が使用されている. しかし, これらは毒性のある加水分解しやすい不安定な溶媒であるため, 取り扱いに注意が必要であり, 対象となる充てん剤にも制限が加えられる. 一方, 高粘性溶液をスラリー溶媒に使用する高粘度充てん法には, 以下のような利点がある. すなわち, ストークスの式より, 高粘性溶液中では粒子の沈降速度が小さくなるために, 粒径の差による沈降速度の差も小となり, 均一に充てんされる. 充てん流速が小さくても高压が得られるため, 低流量ポンプでも充てんが可能である, 広い範囲の溶媒からの選択ができる, などが考えられるが, 詳細に関する検討は, いまだなされていない. そこで, 吸着クロマトグラフィーとしては球形シリカゲルを, 逆相クロマトグラフィーとしては球形 ODS-シリカゲルを充てん剤とし, 高粘度スラリー充てん法の諸条件の検討を行った.

2 実 験

2.1 充てん剤

自製球形シリカゲル²⁴⁾ (細孔直径 100 Å) の未分級のもの (平均粒径 18 μm) 及び湿式法²⁵⁾²⁶⁾ により 3 種類 (平均粒径 17, 23, 29 μm) に分級したものを 120°C で 4 時間乾燥して吸着クロマトグラフィー用として使用した. 逆相クロマトグラフィー用としては自製球形シリカゲル (未分級, 平均粒径 18 μm) をピリジン溶媒中でトリクロロオクタデシルシランでシラン処理をした完全に疎水性の ODS-シリカゲルを使用した. 充てん剤の粒径及びその分布はコールターカウンター TA II 型 (Coulter Electronics 社製), 比表面積は BET 法 (ソーブトマティック・シリーズ 1800, Carlo Erba 社製), 細孔容積は飽和水蒸気吸着法 (重量法) で測定し, 細孔直径は比表面積及び細孔容積より計算した.

2.2 充てん方法

シリカゲルの場合には 1.5 g, ODS-シリカゲルの場合は 2.0 g をビーカーに採り, これに 10 ml のスラリー溶媒を加えてマグネチックスターラーで良くかくはんし, 均一なスラリーとする. このスラリーをあらかじめ下端に 5 μm の焼結フィルターを備えたカラムがセットされた充てん器 (内容積 25 ml, 協和精密製 KGC-P-25U) に移し, 充てん器上端までスラリー溶媒を加え, ふたをした後プランジャー型高圧定流量マイクロポンプ (協和精密製 KHD-52) に接続し, 所定の圧力 {(20~500) kg/

cm²} あるいは流量 {(1~4) ml/min} でスラリー溶媒を送り込み, 充てんを行う. 流量 2 ml/min で後述のクロマト管に充てんした場合, 約 30 分間で充てんは完了する. 充てんされたカラムは, 吸着クロマトグラフィーの場合は *n*-ヘキサン, 逆相クロマトグラフィーの場合はエタノールを流速 2 ml/min で約 10 分間流して洗浄後, HPLC 装置にセットする. スラリー溶媒の粘度はオストワルド粘度計で 20°C において測定した.

2.3 HPLC 装置と測定法

ポンプはプランジャー型高圧定流量マイクロポンプ (協和精密製 KHD-52), 検出器は二波長分光光度計 (日立製作所製 356 型, 測定波長: 254 nm, 対照波長: 300 nm), 流動セルは 8 μl, カラムはすべて 250 × 4 I. D. mm ステンレス製 (協和精密製) を統一して使用し, 配管は 1/16 インチステンレス管及び 0.25 I. D. × 2.0 O. D. mm テフロン管を用いて行った. 試料は吸着クロマトグラフィーでは *o*, *m*, *p*-ジニトロベンゼン (以下 DNB と略記), 逆相クロマトグラフィーではベンゼン, ナフタレン, アントラセンを適当な濃度に希釈し, マイクロシリンジ (Hamilton 製 HP-305, 5 μl) でカラム上部のセプタム式インジェクターを通して (3~5) μl 注入した. 溶離液はそれぞれ 1 v/v% エタノールを含む *n*-ヘキサン溶液, 70 v/v% メタノール水溶液を用いた. カラムの効率には主に *o*-DNB とアントラセンについての理論段数 (*n*) と理論段高 (HETP) で示した. 又 *k'* は試料の保持比である.

2.4 試 薬

n-ヘキサン (HPLC 用) 以外はすべて特級試薬をそのまま使用した.

3 結果と考察

3.1 充てん剤

高効率の HPLC 用カラムを得る目的で, 前述のように各種の充てん法¹⁾⁶⁾²⁰⁾²¹⁾ が研究されてきたが, それらの原理を要約すると, 充てん剤を均一にしかも密に充てんする目的に基づいている.

充てん剤が粒径分布がない, 同粒径の均一な物質から成る完全な球体の場合は, スラリー溶媒を選ぶ際にその粘度あるいは比重を考慮に入れる必要がなくなり, その充てん法は比較的簡易なものとなることが予想される. 最近では充てん剤の製造法あるいは分級法が進歩して, 比較的粒径のそろったものが入手できるようになったが, ある程度の粒径分布は避けられない. そこで本研究

では、粒径分布の影響を顕著にする目的で、自製球形シリカゲルを未分級の状態を用いて充てん条件の検討を行った。又、同一ロットより分級した3種類の粒径の異なる球形シリカゲルについても比較検討した。Fig. 1 はそれらの粒径分布を示す図である。

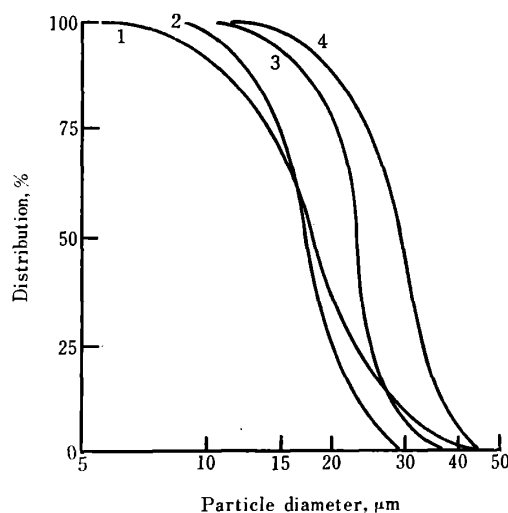


Fig. 1 Particle size distributions of spherical silica gel supports

1: Unsieved; 2~4: Sieved (mean particle diameter: 17, 23, 29 μm)

3.2 スラリー溶媒の検討

高粘度を有する溶媒は多種類存在するが、スラリー溶媒としては以下の条件を満たす溶液が適当である。すなわち、適度な粘度を有する、化学的に安定であり、毒性がない、不純物が少ない、安価でしかも入手しやすい、などである。又 HPLC 溶離液の極性を考慮した場合、吸着クロマトグラフィーでは極性の小さい溶離液を、逆相クロマトグラフィーでは極性の大きい溶離液を用いるため、前者は非極性溶媒、後者は極性溶媒を用いてスラリー充てんを行うことにより、充てん後のカラムの洗浄、洗浄液から溶離液への置換など操作が非常に容易となる。又、シリカゲルの充てんの際のスラリー溶媒の極性に関して、非極性溶媒での充てんが、極性溶媒でのそれより優れているという報告がなされている¹⁰⁾。

Fig. 2 はシリカゲルの充てん時のスラリー溶媒の極性の影響について検討したものである。極性溶媒には *n*-ヘキサノールを、非極性溶媒には流動パラフィンと *n*-ヘキサンの混合溶媒を *n*-ヘキサノールと粘度が等しくなるように調整して用いた。その結果、極性-非極性溶媒の混合比には無関係にスラリー溶媒の粘度は 6.6 cp

とほぼ一定に保つことができる。又比重も (0.81~0.82) g/cm^3 の範囲内でほぼ一定であった。この条件下でスラリー溶媒の流速を 2 ml/min で充てんすると、いかなる混合比でも充てん終了時の圧力は約 100 kg/cm^2 であった。Fig. 2 より、*n*-ヘキサノールの比が大きくなり、溶媒の極性が増大するに伴い、理論段数が減少することより、シリカゲルの充てんには非極性溶媒が適していることが分かる。これは溶媒分子とシリカゲル表面との相互作用に帰因するものと考えられるが、その詳細な機構に関しては不明である。以上より以後の充てん条件の検討は吸着用シリカゲルは流動パラフィン-*n*-ヘキサン系の非極性溶媒を、逆相用 ODS-シリカの場合はグリセリン-エタノール系の極性溶媒をそれぞれ用いて行った。

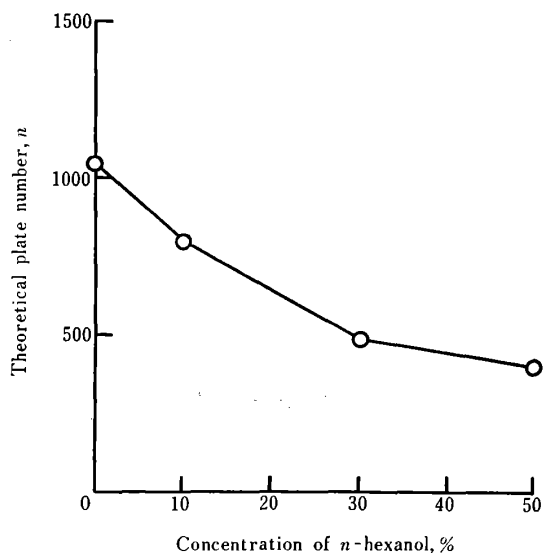


Fig. 2 Effect of polarity of slurry medium on theoretical plate number (n)

Packing conditions: Pressure=100 kg/cm^2 , flow rate=2 ml/min, viscosity of slurry mediums=6.6 cp; Sample: *o*-DNB; Eluent: 1% ethanol in *n*-hexane, 2 ml/min; Silica gel: 18 μm

3.3 充てん条件の検討

Fig. 3 はシリカゲルの充てん時のスラリー溶媒の粘度に関して検討したものである。充てん流速は 2 ml/min に一定し、流動パラフィンと *n*-ヘキサンの混合比を変化して粘度を調整し、得られたカラムの理論段数と、そのときの充てん圧を調べた。溶媒の粘度が増加するに伴い、理論段数は上昇し、カラムの効率が上がる。又充てん圧も当然上昇する。

Fig. 4 は充てん流速による理論段数の影響をスラリー溶媒の粘度をパラメーターとして検討したもので、粘度

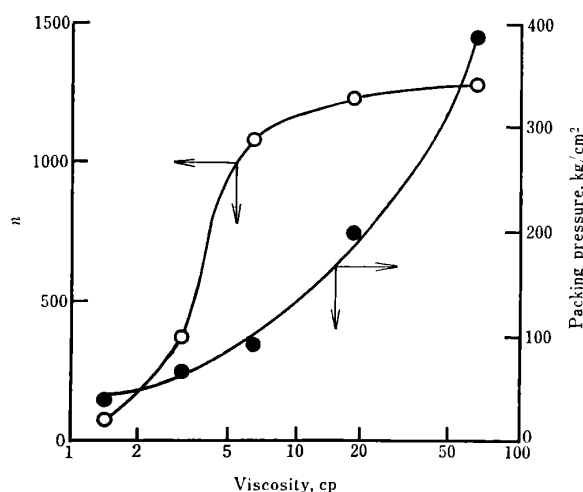


Fig. 3 Effect of viscosity of slurry medium on n and packing pressure

○ Theoretical plate number; ● Packing pressure; Flow rate in packing: 2 ml/min; Sample: *o*-DNB; Eluent: 1% ethanol in *n*-hexane, 2 ml/min; Silica gel: 18 μ m

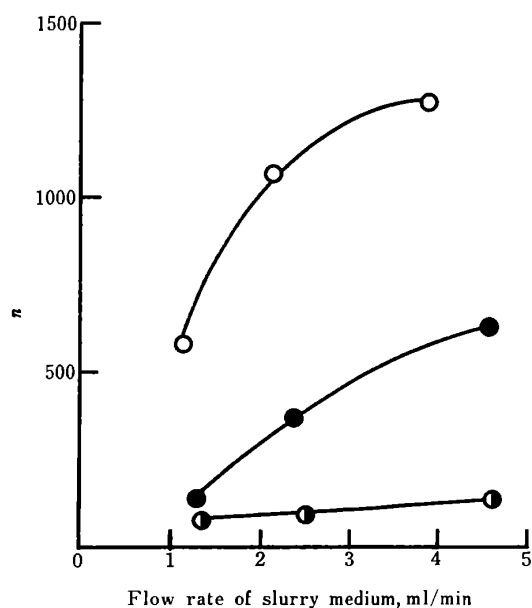


Fig. 4 Relationship between flow rate in packing and n at various viscosity of slurry mediums

○ 6.6 cp; ● 2.8 cp; ● 1.5 cp; Sample: *o*-DNB; Eluent: 1% ethanol in *n*-hexane, 2 ml/min; Silica gel: 18 μ m

が高いほど、又流速が大きいほど理論段数は増加する。

以上の結果より、高粘度スラリー法で充てんされたカラムの性能は、充てん圧に大きく影響されると考えられたので、種々の条件を充てん圧で整理した結果が Fig. 5 である。これで分かるように、溶媒の粘度あるいは充て

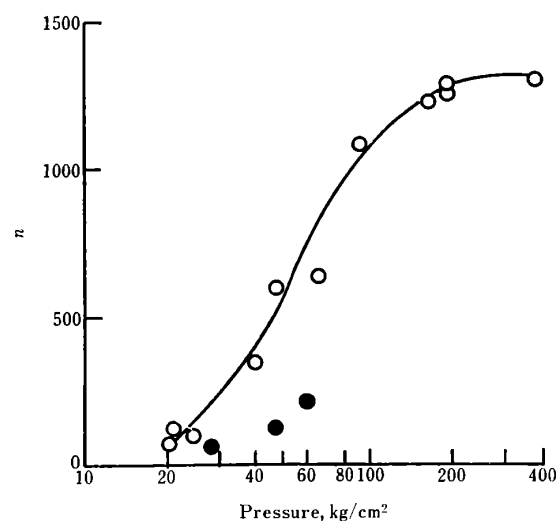


Fig. 5 Effect of packing pressure on n

○ Liquid paraffin/*n*-hexane ≥ 1 ; ● Liquid paraffin/*n*-hexane = 2/3; Sample: *o*-DNB; Eluent: 1% ethanol in *n*-hexane, 2 ml/min; Silica gel: 18 μ m

ん流速の相違にかかわらず、充てん圧と理論段数との間には相関関係が認められ、充てん圧が高いほど、理論段数の大きい、効率の良いカラムが得られることが判明した。又 Fig. 5 において●印の3点が、曲線上から外れているが、これらは *n*-ヘキサンの比が大きい、粘度が低い溶媒で充てんした測定点である。このような低粘度の溶媒中では粒径分布による粒子の沈降速度の差が大となり、不均一な状態で充てんされるため、カラム効率が低下するものと考えられる。

Fig. 6 は同様に逆相用充てん剤である ODS-シリカゲルのスラリー充てんについて検討した結果である。グリセリン-エタノール系の混合比を変えて粘度を調整し、スラリー溶媒の粘度に対する充てん圧及び得られたカラムの理論段数を調べた。一定流速で充てんする場合は、シリカゲルの充てんと同様、粘度が高くなるに伴い、充てん圧及び理論段数は増大する。理論段数はまだ増加傾向にあるが、ポンプの耐圧などにより、実験は圧力 500 kg/cm² までしか行えなかった。

3.4 充てん剤の粒径とカラム効率

Fig. 7 は、同一ロットより分級して得られた平均粒径がそれぞれ 17, 23, 29 μ m の球形シリカゲルを、同一溶媒を用い、同一圧力で充てんしたカラムについて、HETP に対する溶離液の線流速依存性を検討した結果である。粒径及び線流速が大となるほど、HETP は大となり、カラム効率は低下する。又、線流速 $u=1$ cm/s における粒径と HETP との関係について検討し、平衡

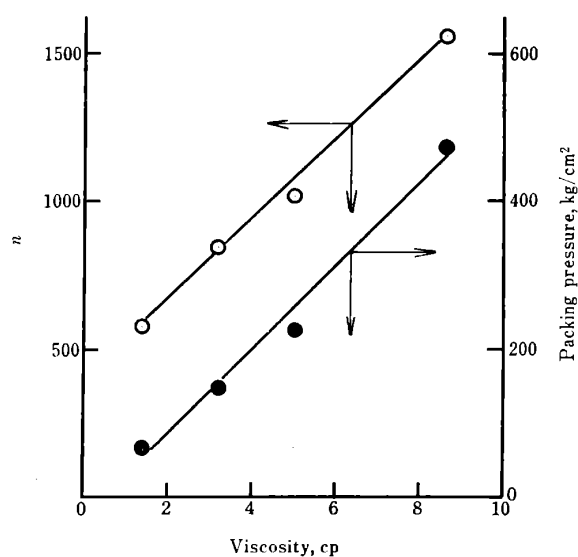


Fig. 6 Slurry packing of ODS-silica with viscous slurry medium

○ Theoretical plate number; ● Packing pressure;
Sample: Anthracene; Eluent: 70% methanol in water,
2 ml/min; ODS-silica gel: 18 μ m

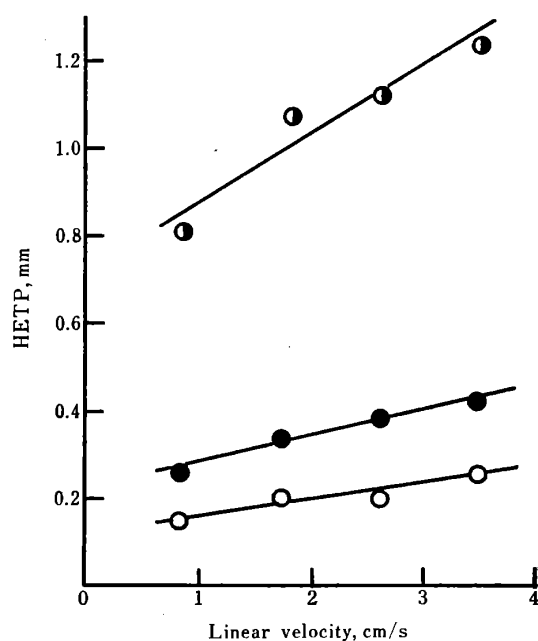


Fig. 7 Relationship between HETP and linear velocity for various particle size spherical silica gel supports

○ 17 μ m; ● 23 μ m; ◐ 29 μ m; Packing conditions:
Liquid paraffin/*n*-hexane=8/2 (22 cp), pressure=200
kg/cm²; Sample: *o*-DNB (k' =43); Eluent: 1%
ethanol in *n*-hexane

スラリー法の結果と比較した図が Fig. 8 である。Fig. 8 中の実線は、Endele ら⁹⁾の平衡スラリー法による結果であり、試料及び溶離液は異なるが、両者の相関はよく

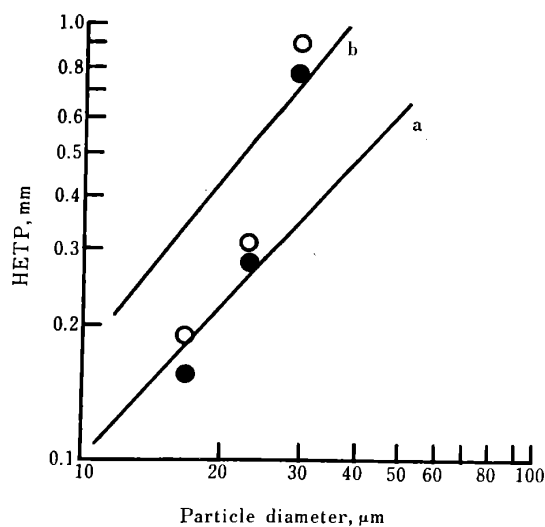


Fig. 8 Effect of particle diameter of spherical silica gel on HETP and comparison with the result by balanced-density slurry packing technique⁹⁾ at $\mu=1$ cm/s

— By balanced-density slurry packing technique,
a: benzene (k' =0.29~0.40), b: *o*-terphenyl (k' =
1.26~2.30), eluent: *n*-heptane; Viscosity slurry
packing technique: ○ *m*-DNB (k' =16), ● *o*-DNB
(k' =43), eluent: 1% ethanol in *n*-hexane

一致している。又未分級のもの、分級を行ったものと比較して、多少カラム効率が低く、分級効果が認められた。

4 結 言

高粘性溶媒を用いるスラリー充てん法について詳細な検討を行った。球形シリカゲルによる吸着クロマトグラフィー用カラムは流動パラフィン-*n*-ヘキサン系溶媒を、球形 ODS-シリカゲルによる逆相クロマトグラフィー用カラムはグリセリン-エタノール系溶媒をそれぞれ使用し、いずれもなるべく高压で充てんすることにより、効率の良いカラムが得られる。又本法によるシリカゲルの粒径と HETP との相関は、平衡スラリー法のそれとよく一致した。

(1976年4月、日本化学会第34)
(春季年会において一部発表)

文 献

- 1) L. R. Snyder: *Anal. Chem.*, **39**, 698 (1967).
- 2) H. N. M. Stewart, R. Amos, S. G. Perry: *J. Chromatogr.*, **38**, 209 (1968).
- 3) J. J. Kirkland: *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 129 (1972).
- 4) M. C. Beachell, J. J. DeStefano: *ibid.*, **10**, 481 (1972).
- 5) J. J. Kirkland: *ibid.*, **9**, 206 (1971).

- 6) R. E. Majors : *Anal. Chem.*, **44**, 1722 (1972).
- 7) R. E. Majors : *J. Chromatogr. Sci.*, **11**, 88 (1973).
- 8) R. M. Cassidy, D. S. LeGay, R. W. Frei : *Anal. Chem.*, **46**, 340 (1974).
- 9) R. Ende, I. Harász, K. Unger : *J. Chromatogr.*, **99**, 377 (1974).
- 10) C. D. Scott, N. E. Lee : *ibid.*, **42**, 263 (1969).
- 11) J. J. Kirkland : *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 593 (1972).
- 12) B. Coq, C. Gonnet, J. L. Rocca : *J. Chromatogr.*, **106**, 249 (1975).
- 13) J. H. Knox, A. Pryde : *ibid.*, **112**, 171 (1975).
- 14) G. B. Cox, C. R. Loscombe, M. J. Slucutt, K. Sugden, J. A. Upfield : *ibid.*, **117**, 269 (1976).
- 15) J. M. Bather, R. A. C. Gray : *ibid.*, **122**, 159 (1976).
- 16) T. J. N. Webber, E. H. McKerrell : *ibid.*, **122**, 243 (1976).
- 17) S. H. Chang, K. M. Gooding, F. E. Regnier : *ibid.*, **125**, 103 (1976).
- 18) J. J. Kirkland, P. E. Antle : *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 137 (1977).
- 19) C. J. Little, A. D. Dale, D. A. Ord, T. R. Marten : *Anal. Chem.*, **49**, 1311 (1977).
- 20) J. Asshauer, I. Harász : *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 139 (1974).
- 21) H. R. Linder, H. P. Keller, R. W. Frei : *ibid.*, **14**, 234 (1976).
- 22) H. P. Keller, F. Erni, H. R. Linder, R. W. Frei : *Anal. Chem.*, **49**, 1958 (1977).
- 23) P. A. Bristow, P. N. Brittain, C. M. Riley, B. F. Williamson : *J. Chromatogr.*, **131**, 57 (1977).
- 24) 野村 明, 森田弥左衛門, 小暮幸全 : 日化会誌, **1978**, 832 (1978).
- 25) P. B. Hamilton : *Anal. Chem.*, **34**, 2055 (1963).
- 26) C. D. Scott : *ibid.*, **24**, 292 (1968).

☆

Viscosity slurry packing technique for high-performance liquid chromatographic columns.

Akira NOMURA, Yazaemon MORITA and Yukitoshi KOGURE (National Chemical Laboratory for Industry, 1-1-5, Honmachi, Shibuya-ku, Tokyo)

The viscosity slurry packing technique for high-performance liquid chromatographic columns, both adsorption chromatography using spherical silica gel and reversed-phase chromatography using spherical ODS-silica, was investigated in detail to obtain high column efficiencies. Non-polar viscous solvent, a mixture of liquid paraffin and *n*-hexane as a dispersing agent for silica gel supports, and polar viscous solvent, a combination of glycerol and ethanol for ODS-silica supports, were applied to the slurry packing technique. Column dimensions were 4 mm in I.D. and 250 mm in length. Eluents were 1% ethanol in *n*-hexane for adsorption chromatography and 70% methanol in water for reversed-phase chromatography. High pressure during the packing procedure was necessary to obtain high column efficiencies. Use of viscous slurry solvents has an advantage of eliminating the problem of different sedimentation speed of the supports causing the longitudinal irregularity of particle size distribution, and also the requirement of a high pressure pump with large capacity. Three different sieve fractions of spherical silica gel (17,23,29 μm) separated from the same silica gel prepared in our laboratory were packed with the same viscous slurry medium (22 cp) at the same pressure (200 kg/cm²), and the influence of the particle size on column efficiencies (HETP) was determined and compared with that of the balanced-density slurry packing technique investigated by R. Ende *et al.*

(Received Mar. 6, 1978)

Keywords

High-performance liquid chromatography

ODS-silica gel

Silica gel

Slurry packing technique

Viscous solvent