

分析化学総説

液体クロマトグラフィーにおける間接吸光度
検出法の新展開早川 和一^{®*}, 山本 敦^{**}

(1995 年 1 月 30 日受付)

これまで、液体クロマトグラフィーにおける吸光度検出器は専ら光吸収を有する化合物を検出する装置であり、その原理と検出器は既に完成されたものの印象が強かった。本総説は、上述の概念を大きく変革しつつある吸光度検出法の新展開として、光吸収のない対象物質を検出できる間接吸光度検出法と、更にその考え方を光学活性物質の検出に向けた偏光吸光度検出法に焦点を合わせ、著者らの研究成果も含めて紹介する。

1 はじめに

液体クロマトグラフィーは種々の化合物の分離・分析手段として大きな役割を果たしてきた。そこでは、目的物質の検出に吸光度検出器が最も用いられているが、それでは検出できない、あるいは満足な結果が得られないことに直面した研究者も多いであろう。

従来から吸光度検出器は専ら光吸収を有する化合物を検出するものであるとの観念が強く、これを光吸収のない化合物へ適用することは論外とされていた。そのために吸光度検出法では分析が難しいと考えられてきた対象も少なくない。

本稿では、吸光度検出法の概念を大きく拡大して、光吸収のない対象物質をも検出できるいわゆる間接吸光度検出法と、更にその考え方を光学活性物質の検出に展開した偏光吸光度検出法について、基礎と応用の両面にわたり、歴史的な背景も踏まえて最近（1994 年前半）の研究までを紹介する。既にこれら二つの検出法に関連する幾つかの総説・解説や成書^{1)~5)}があり、又イオンクロマトグラフィー領域の研究についても関連する総説・解説^{6)~12)}がある。併せて参考になろう。

2 間接吸光度検出法開発の歴史的背景

2・1 Hummel-Dreyer pattern 及び vacancy chromatography

1960 年代より、タンパク質と薬物などの結合を解析する方法の一つとして、光吸収の大きな薬物を含む溶液を移動相とするゲル汙過クロマトグラフィーが行われていた。この系にタンパク質を含む試料溶液を注入してカラム溶出液の吸光度をモニターすると、タンパク質の溶出位置に薬物濃度の増加に伴う吸光度の増加（山）が生じ、その後に薬物濃度の減少に伴う吸光度の減少（谷）が生ずる。Fig. 1 は 2'-シチジル酸の 9×10^{-5} M 溶液を移動相とする Sephadex G-25 カラム（0.4 cm i.d. $\times$ 100 cm）に 2 mg の RNAase を注入して両者の結合を見たクロマトグラムである。このパターンを“Hummel-Dreyer pattern”と呼び、観察される正、負ピークの大きさから、タンパク質と薬物の結合の強さと結合比を解析する方法である^{13)~15)}。対象が銅などの金属イオンでは、検出に原子吸光光度計を用いた場合も見られる。

一方、試料が気体などの場合のように揮散しやすく、定量的なサンプリングや注入が必ずしも容易でない成分の定量法として、“vacancy chromatography”が考え出された¹⁶⁾。これは、モニタリングすべき試料（気体）を常時移動相として流し、逐次一定濃度の標準気体を一定量注入したときに生ずる検出器応答の変化量から、試料成分の濃度を定量する方法である。この方法は、1970 年代に入ると液体クロマトグラフィーの領域に導入され、あらかじめ光吸収を有する試料成分を一定濃度含む

* 金沢大学薬学部: 920 石川県金沢市宝町 13-1

** 富山県衛生研究所: 939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山 17-1

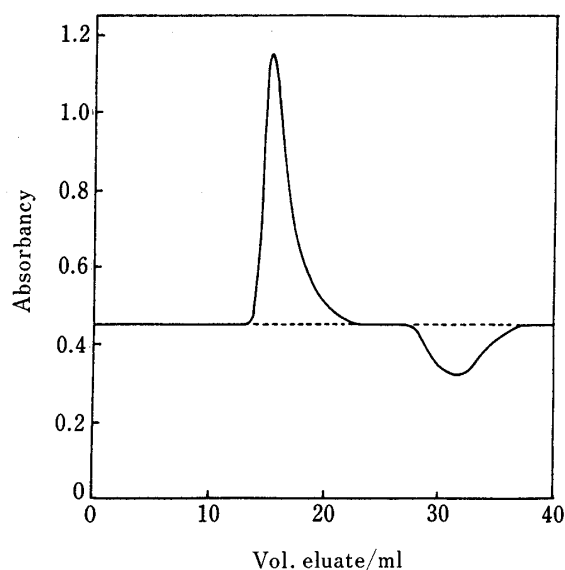


Fig. 1 Elution profile of the 285 nm absorbance accompanying the passage of pancreatic RNAase through a column of Sephadex G-25 gel which was equilibrated with 2'-cytidylic acid¹³⁾

Mobile phase: 0.09 mM 2'-cytidylic acid; Sample amount: 2 mg

移動相を流し、試料を注入後カラム溶出液が示す吸光度の増減から目的成分の定量を行う方法として利用された¹⁷⁾。この方法では、 X_0 を移動相中の目的成分の初期濃度、 X_1 を注入試料中の目的成分濃度とすると、 N 段後の溶液中の目的成分濃度 (X_N) は式(1)で与えられることが報告されている。

$$X_N = (X_1 - X_0) \frac{X_0 e^{-(v-N)^2/2N}}{\sqrt{2\pi N}} \quad (1)$$

ここで、 N は理論段数、 v はカラム内の移動相容積 (段数) を表す。すなわち、目的成分が光吸収を有するならば、カラム溶出液の吸光度は注入された試料溶液中の成分濃度が移動相中の初期濃度より高ければ ($X_1 > X_0$) 増加し、逆ならば ($X_1 < X_0$) 減少することを示している。

2・2 逆相クロマトグラフィーにおける非電解質の間接吸光度検出

1980年代に入り、液体クロマトグラフィーの移動相に光吸収成分を添加することによって、光吸収を持たない非電解質を定量分析する方法が展開されるようになった¹⁸⁾¹⁹⁾。これは水性移動相に疎水性の化合物を極微量共存させ、その濃度変化から非電解質の溶出を検出する

ものである。この方法は、実用分析法としては普及しなかったが、その後の逆相カラムにおける保持溶出機構解明に一石を投じることになった。

まず、ソルボホビック理論で支持される試料の保持式を基にして、観察されるピークの強度に関する次式が誘導された²⁰⁾²¹⁾。

$$h = Ck'_a / (k'_b - k'_a) \quad (2)$$

ここで、 h は試料ピーク高さ、 k'_a と k'_b はそれぞれシステムピークと呼ばれる添加剤由来のピーク及び試料ピークの保持比、又 C は定数を表す。一方、競合吸着モデルからも同様の式が誘導された²²⁾²³⁾。

$$h = Ck'_b / (k'_a - k'_b) \quad (3)$$

これら二つの式から算出される試料ピーク強度の差はわずかであり、実験的な保持機構の証明は困難であった。しかし、溶質がカラム担体に Langmuir 吸着されるという仮説のもとで式(3)の展開を行うと、移動相中への添加剤濃度と試料ピーク強度との関係式が理論的に誘導される²⁴⁾ ことより、逆相カラムにおける競合吸着モデルが支持されている。

2・3 イオン相互作用クロマトグラフィーと間接吸光度検出クロマトグラフィー

1970年代末より1980年代初めにかけて、電解質を対象とした間接吸光度検出法が、逆相クロマトグラフィーの場合においては ion interaction chromatography (イオン相互作用クロマトグラフィー)²⁵⁾、イオン交換クロマトグラフィーの場合においては indirect photometric chromatography (間接吸光度検出クロマトグラフィー)²⁶⁾ の名称で展開されることになる。これらは、特にイオンクロマトグラフィーの領域で間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーとして大きく花開いたが、同時にそれまで不明な点が多く残されていた分析カラム内の保持・分離機構の解明にも大きく貢献することになった。

3 示差吸光度検出法

さて、移動相に検出目的成分とは異なる適当な光吸収を有する成分を添加し、更にカラム内の交換基上で移動相成分と試料成分とが化学量論的に交換反応を生じている場合に上述の式(1)をあてはめ、次のように一般化した示差吸光度検出理論が誘導された¹⁾。

陰イオン交換クロマトグラフィーを例にすると、平衡状態にあるカラム内のイオン交換基上では、試料イオン (S^-) は溶離剤イオン (E^-) (いずれも一価陰イオンと

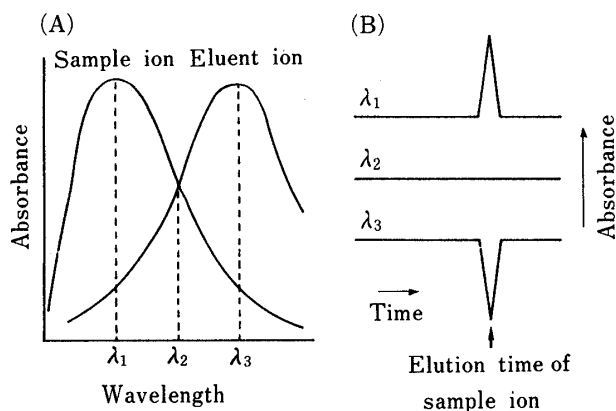


Fig. 2 Absorbance detection in ideal ion exchange chromatography¹⁾

(A) absorbance spectra of sample and eluent ions;
(B) chromatograms detected at different wavelength

する)と1:1の交換反応を繰り返しながらカラム内を移動して溶出される。このとき、 S^- の溶出に伴って現れる吸光度変化量(ピーク面積, PA)は式(4)で表される。

$$PA \propto C_S(A_S - A_E) \quad (4)$$

ここで、 C_S は S^- の注入量、 A_S 、 A_E はそれぞれ検出波長 λ における S^- 、 E^- の当量吸光度を表す。いま、 S^- 及び E^- がFig. 2(A)のような光吸収スペクトルを持つとき、得られるクロマトグラムパターンは検出波長により異なる。すなわちFig. 2(B)のクロマトグラムパターンのように、検出波長が λ_1 のときは $A_S > A_E$ であるので式(4)の右辺 >0 となり正ピークが現れる。検出波長が λ_3 のときは $A_S < A_E$ で負ピークが現れ、 λ_2 のときは $A_S = A_E$ でピークは現れない。従来の液体クロマトグラフィーにおける吸光度検出法は、専ら光吸収のない溶離剤を用いて光吸収を有する試料成分を検出する $A_S > A_E$ ($\neq 0$)のパターンであった。

ところで、試料に光吸収の大きな成分(S_1)と小さな成分(S_2)が同時に含まれるとき、 $A_E \neq 0$ を条件とする従来の液体クロマトグラフィーでは前者のみが検出されて後者は検出できなかった。そこで、上述した示差吸光度検出の原理に従って、溶離剤とその検出波長(λ)を $A_{S1} > A_E > A_{S2}$ となるように選択すると、それぞれ正、負のピークとして同時検出される²⁷⁾²⁸⁾。又、試料に目的成分(S)以外の光吸収を有する成分(T)が共存するために、目的成分の検出が妨害される場合がある。このようなとき、 $A_E = A_T$ ($\neq A_S$)となるように検出波長

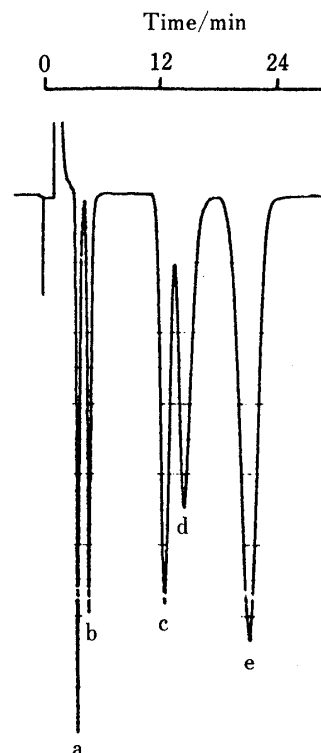


Fig. 3 Chromatogram of inorganic anions by indirect photometric detection²⁶⁾

Column: anion exchanger; Eluent: 1 mM disodium phthalate (pH 7~8); Detection: 254 nm. Sample: a, Cl^- (2 mM); b, NO_2^- (2 mM); c, Br^- (5 mM); d, NO_3^- (5 mM); e, SO_4^{2-} (5 mM)

(λ)を選択するか、あるいは妨害成分(T)を溶離剤とすることにより、この問題の解決が図られている²⁹⁾。

4 間接吸光度検出イオンクロマトグラフィー

4.1 イオン交換クロマトグラフィー

4.1.1 熱力学的平衡モデルと理論式の誘導 紫外・可視吸収がないか、あるいは小さいものが多い無機イオンや有機酸を対象とする場合は、 $A_S < A_E$ の間接検出方式が有効である。特に $A_S = 0$ のとき、式(4)の右辺 $= -C_S A_E$ となり、式(5)のようにシグナルの大きさ(負ピークの面積)は C_S と A_E に比例する。

$$PA \propto C_S A_E \quad (5)$$

Fig. 3は2 mMの塩化物イオン、亜硝酸イオンと、5 mMの臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオンを含む試料を陰イオン交換カラムに注入して、1 mM フタル酸二ナトリウム溶離液(pH 7~8)を用いて分離し、254 nmで検出したクロマトグラムである。いずれの試料イ

オンも負ピークとして検出され、しかもピークの面積比較より式(5)が成立することが分かる。負の出力信号を検出に利用することは、そもそも電気的検出を用いるガスクロマトグラフィーでは特別なことではない。このような考え方は吸光度検出にとどまらず、やがて示差屈折率検出⁽³⁰⁾⁽³¹⁾や蛍光検出^{(32)~(34)}に応用されるようになり、最近注目を浴びているキャピラリー電気泳動でも一つの検出法としての評価を得ている⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾。

式(5)並びに Fig. 3 の結果は、試料成分のイオン価が等しければ、ピーク面積が種類によらずその絶対注入量に比例することを示している。例えば、試料成分のイオン価が2倍、3倍になればピーク面積も2倍、3倍になる。このことより、既知量の標準イオンのピーク面積から未知試料成分の量(又は濃度)を推定できることが報告されている⁽³⁷⁾。

吸光度検出器を用いて精度よく測定できる範囲(一般に吸光度が1以下とされる)では、クロマトグラムに現れるノイズの大きさ(N)は次式に従いバックグラウンド(すなわち移動相溶液)の吸光度($C_E A_E$)に比例する。

$$N = K C_E A_E \quad (6)$$

ここで、 K は装置に係わる定数を表す。式(5)、(6)より、検出感度の指標となるシグナルとノイズの比(S/N)は次式で表される。

$$S/N = C_S / K C_E \quad (7)$$

従って、本法の検出下限(C_S)は溶離剤濃度(C_E)が低いほど下がる⁽¹⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾。

式(5)は試料成分の保持分離にイオン交換反応のみが係わる時成立する。ところが、例えば酸性 pH の芳香族カルボン酸溶離液を用いると、試料成分の種類に依存しない大きなベースライン変動(システムピーク)が試料成分のピークとは異なる位置に現れ、しかも試料成分ピークの大きさは式(5)に従わないことが見いだされた⁽³⁹⁾。すなわち、試料成分のピークはシステムピークより前では正(吸光度の増加)、後では負(吸光度の減少)となり、それらの面積はシステムピークに近いほど大きくなった(Fig. 4)。段階論に基づいてこのピーク生成機構の解明を行った結果、試料成分の保持はイオン交換平衡に支配されるが、溶離剤の保持はその非解離型の吸着平衡に支配されること(Fig. 5)、更に、試料成分のピーク面積(PA)と試料成分ピーク及びシステムピークの保持比(k'_s, k'_e)の間には式(8)が成立し、この式に基づくコンピュータシミュレーション結果も実際の

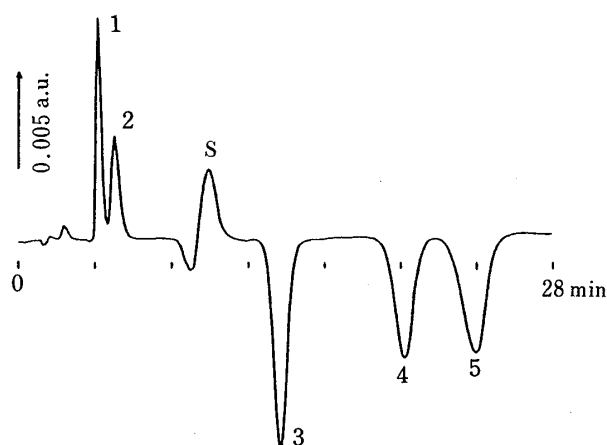


Fig. 4 Chromatogram of sample and system peaks with an organic acid solution at low pH as the mobile phase⁽³⁹⁾

Column: TSKgel IC-Anion-PW; Mobile phase: 0.5 mM sulphanic acid (pH 3.5); Detection: 271 nm. Peaks: 1, acetate (7 nmol); 2, laevulinate (2.5 nmol); S, system peak; 3, lactate (2.5 nmol); 4, formate (2.5 nmol); 5, succinate (2.5 nmol)

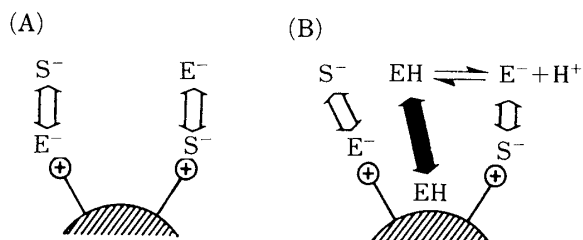


Fig. 5 Retention mechanisms of sample and eluent species in anion exchange column⁽⁵⁾

(A) model of ideal ion exchange, (B) mixed model of ion exchange and absorption. S^- : sample anion; E^- : eluent anion; $\oplus$: anion exchanger

クロマトグラムと一致することが確かめられた⁽³⁹⁾。

$$PA \propto k'_s / (k'_e - k'_s) \quad (k'_s \neq k'_e) \quad (8)$$

この理論式は試料成分ピーク、あるいはシステムピークの保持時間を調節することにより、特定ピークの感度増強・抑制が可能なことを示しており、式(5)が成立する標準条件を使用する間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーでしばしば生ずる感度不足や共存ピークの妨害などの問題解消に有効である⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾。

更に、上述のシステムピークの保持比を用いて、溶離剤のカラム担体に対する等温吸着線の作成法が提案され

た⁴²⁾. これをシステムピークを生ずる溶離液系に適用した結果, 非解離型溶離剤の吸着は *bi*Langmuir 式に従っていることが明らかにされ, システムピークの溶出挙動が予測可能となった.

イオンクロマトグラフィーのみならず一般のイオン交換クロマトグラフィーでは, 多価塩基酸類を成分とする溶離液を用いることが多い. しかし, 一価イオンの単成分溶離剤のみの理想状態について導き出された従来のイオン交換理論式は, 多価塩基酸のような多成分系の解析には適用できなかった. ところが, 多成分系モデルとして提案された Hoover モデル⁴³⁾に更に溶離剤間分離係数という新たな概念を導入することにより, 多価塩基酸溶離剤系における試料成分 (多価イオンを含む) の溶出が初めて予測可能になった⁴⁴⁾. このことは, イオン交換体が表面電気二重層を形成していることを意味し, 後述するイオン相互作用クロマトグラフィーにおける保持理論としての動的と静的イオン交換モデルを区別することの必然性がなくなる.

ところで, 従来の主要陰イオンを対象とするイオンクロマトグラフィーにおける課題の一つとして, 一価イオンと比較して二価イオンである硫酸イオンの溶出が遅いことが挙げられる. 一方, 溶離液にトリエチレンテトラミンを添加することにより硫酸イオンの保持時間のみを短縮できることが知られていた. これに上述の解析理論を適用して, 硫酸イオンとトリエチレンテトラミンの錯体生成定数が求められるとともに, 硫酸イオンの溶出時間の選択的調節が初めて可能になった⁴⁵⁾. こうして, 電気伝導度検出と吸光度検出という方式の違いによらず, イオンクロマトグラフィーではこれまで経験に頼らざるを得なかった最適溶離液条件の理論予測の道が開かれた.

4・1・2 分離カラム・充てん剤 式(7)で述べたように, 本法の検出感度は溶離剤濃度を下げるほど向上する. しかし, 分析 (分離) カラムを変えずに溶離剤濃度を下げると, 試料成分の溶出が遅れる. ピーク幅が増加し, ピーク高さ (深さ) は減少するため, 感度は向上しない. 従って, 検出感度を向上させるためには, イオン交換容量が小さくても理論段数の高い分析カラムが必要である. 間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーには, おおむね 0.01~0.1 meq/g の範囲のイオン交換容量を持つ充てん剤が使用されている. 従来の電気伝導度検出イオンクロマトグラフィー用の分離カラムの多くもこの範囲にあり, 間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーに活用されている. 又, 一般の高速液体クロマトグラフィー用分析カラムの中にも利用できるものがあ

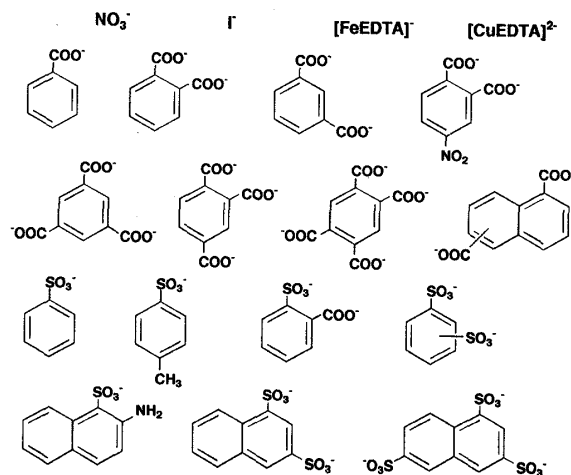


Fig. 6 Eluent ions for anion chromatography with indirect photometric detection

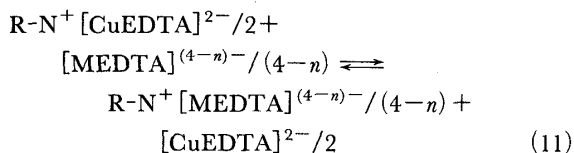
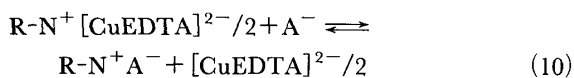
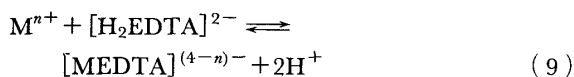
る²⁾⁴⁶⁾. このように, 本法の性能は分析カラム及びその充てん剤の性質と密接に関連している. イオンクロマトグラフィー全般の分析カラム及び充てん剤の開発研究については, 著者らの最近の総説¹¹⁾¹²⁾に一部記載したので参考にしていただきたい.

4・1・3 溶離剤 間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーには, イオン交換溶出力が強く, 紫外, 又は可視吸収の大きな溶離剤が使用される. 陰イオン分析に用いられる主な溶離剤種 (陰イオン成分) を Fig. 6 に示した. 初期には硝酸イオンやヨウ素イオンなど²⁶⁾が使用されたが, 無機陰イオンを溶離剤に用いた報告は少なく, 専ら有機陰イオン性物質が用いられる. 芳香族カルボン酸類では, ベンゼンモノカルボン酸である安息香酸²⁶⁾や 4-アミノ-2-ヒドロキシ安息香酸⁴⁷⁾, ジカルボン酸であるフタル酸²⁶⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾やイソフタル酸⁵⁰⁾, ニトロフタル酸¹⁾, トリカルボン酸であるトリメシン酸²⁶⁾やトリメリット酸^{51)~53)}, 更にテトラカルボン酸であるピロメリット酸^{54)~56)}などが使用されている. 一般に, カルボキシル基の数が増えるほどイオン交換溶出力が強くなるため溶離液濃度を下げることができ, 高感度検出が可能である⁵²⁾⁵³⁾.

ところで, カルボキシル基は弱酸であり, 低 pH 領域では $R-COOH \rightleftharpoons R-COO^- + H^+$ の平衡は左に移行する. Fig. 5 で示したように, 非解離型溶離剤 ($R-COOH$) はカラム充てん剤担体に吸着する. その結果, 特定の試料ピークについては検出感度の向上が期待できるが, 非解離型溶離剤の吸着反応に起因するシステムピークが生ずる. これを避けるためには, 溶離剤とし

て pH によらず解離が十分な芳香族スルホン酸類が良いと報告された。ベンゼンスルホン酸やトルエンスルホン酸をはじめとするベンゼンモノ-, ジスルホン酸²⁶⁾²⁹⁾⁵⁷⁾, 更に吸光係数が大きい 2-ナフチルアミン-1-スルホン酸⁵⁸⁾やナフタレンジ-, トリスルホン酸類が使用される^{59)~67)}。

カルボン酸類の中にはアルカリ土類金属イオンと陰イオン錯体を生成するものがある。この反応を利用したアルカリ土類金属イオンと無機陰イオンや有機酸の同時分析が、クエン酸²⁷⁾やエチレンジアミン四酢酸(EDTA)²⁸⁾を溶離液とする系で報告されている。しかし、これらの溶離剤の吸光度は小さく、検出ピークもあまり大きくなかった。その後、EDTA が幾つかの遷移金属イオンと大きな紫外・可視吸収を有する陰イオン錯体を生成することを利用したアルカリ土類金属イオンとそのほかの無機陰イオン、有機酸の同時分析法が報告された。すなわち、EDTA は式(9)に従って、多くの二価、三価金属イオン (M^{n+}) と陰イオン錯体を生成する。その一つとして、紫外吸収が大きく、しかも錯体の生成定数も大きなエチレンジアミン四酢酸銅(II) 陰イオン錯体 ($[Cu(EDTA)]^{2-}$) に着目し、これにアルカリ土類金属イオンと陰イオン錯体を生成させるための EDTA を過剰に添加した溶離液を用いることにより、式(10), (11) のように無機陰イオンや有機酸イオン (A^-) のみならず、アルカリ土類金属イオンも陰イオン交換クロマトグラフィーで分離され、間接吸光度検出される。



ここで、 $R-N^+$ は陽イオン基を表す。Fig. 7 にはそのクロマトグラム例を示した⁶⁸⁾⁶⁹⁾。更に、芳香族カルボン酸の一つであるピロメリット酸溶離液を用いたアルカリ土類金属イオンと無機陰イオンの同時分析も報告されている (Fig. 8)⁵⁶⁾。ここでは、紫外吸収の大きい錯体を生成する前者は正ピーク (吸光度の増加)、紫外吸収の小さい後者は負ピーク (吸光度の減少) を呈している。同様のクロマトグラムが 1,2-ジアミン四酢酸銅(II)

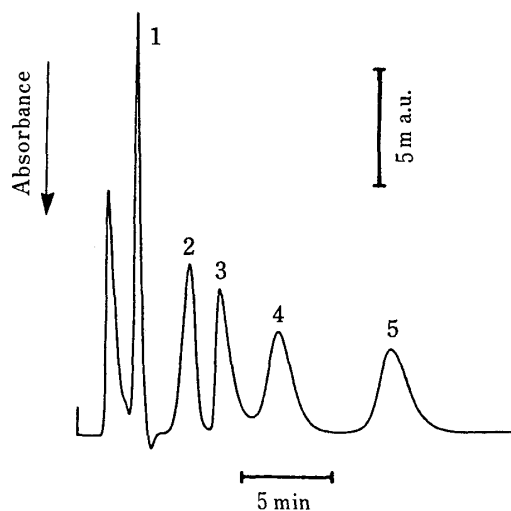


Fig. 7 Chromatogram of inorganic anions, magnesium and calcium ions using metal complex eluent⁶⁸⁾
Column: MCI GEL SCA-02; Eluent: 0.5 mM $Na_2[Cu(EDTA)]$ -0.05 mM Na_2H_2EDTA ; Detection: 290 nm. Peaks: 1, Cl^- (8 nmol); 2, Ca^{2+} (4 nmol); 3, NO_3^- (8 nmol); 4, Mg^{2+} (4 nmol); 5, SO_4^{2-} (4 nmol)

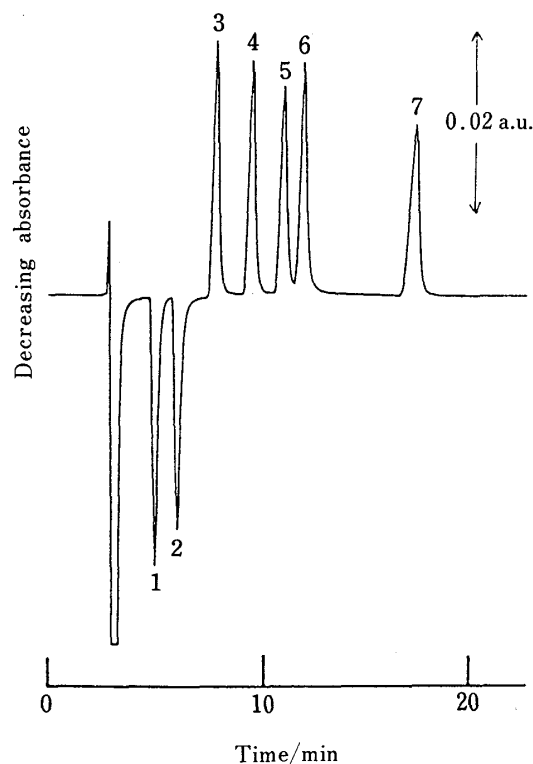


Fig. 8 Chromatogram of inorganic anions, magnesium and calcium ions using pyromellitate eluent⁵⁶⁾
Column: TSKgel IC-Anion-PW; Eluent: 0.15 mM pyromellitate (pH 5.5); Detection: 262 nm. Peaks: 1, Mg^{2+} (0.02 mM); 2, Ca^{2+} (0.04 mM); 3, Cl^- (0.04 mM); 4, NO_2^- (0.04 mM); 5, Br^- (0.04 mM); 6, NO_3^- (0.04 mM); 7, SO_4^{2-} (0.02 mM)

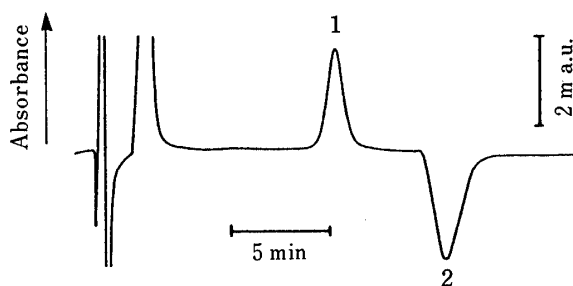
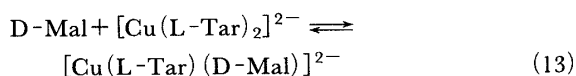
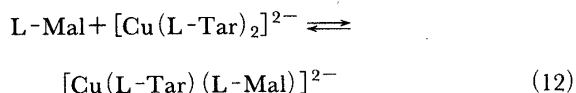


Fig. 9 Chromatogram of malate enantiomers using ligand exchange metal complex⁷³⁾

Column: TSKgel IC-Anion-PW; Eluent: 1.5 mM $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -3 mM L-tartrate (pH 4.7); Detection: 283 nm. Peaks: 1, L-malate; 2, D-malate (each 0.1 μmol)

溶離液でも報告されている⁷⁰⁾。もちろん Fig. 6 に掲げた溶離剤種の中で、はん用される芳香族カルボン酸類や芳香族スルホン酸類に EDTA を添加して溶離液を調製するか、あるいはあらかじめ試料に EDTA を添加すれば、多価金属イオンと無機陰イオンの同時分析が可能である⁶³⁾⁷¹⁾⁷²⁾。

又、金属錯体溶離液の配位子交換反応を利用することにより、吸光度検出イオンクロマトグラフィーで光学異性有機酸の直接分離分析が報告されている。Fig. 9 に銅(II)・L-酒石酸錯体系溶離液を用いて D-, L-リンゴ酸を分離検出したクロマトグラム例を示した。銅(II)と L-酒石酸から生成される陰イオン錯体 $[\text{Cu}(\text{L-Tar})_2]^{2-}$ は紫外吸収を有するので、283 nm で検出可能である。この錯体の配位子である L-酒石酸が、分離カラム内で試料成分のリンゴ酸 (Mal) と配位子交換反応を生ずるが、式 (12), (13) に示すようにリンゴ酸が L-体か D-体かの違いによって生成する錯体の構造と安定度定数が異なる。このために保持と吸光度に変化が生じ、その結果、L-リンゴ酸は正ピーク、D-リンゴ酸は負ピークを与えると考察されている⁷³⁾⁷⁴⁾。



陽イオン分析に用いられる主な溶離剤種 (陽イオン成分) を Fig. 10 に示した。まず、紫外吸収を有する無機溶離剤では銅(II)イオン²⁶⁾やセリウム(III)イオン⁷⁵⁾がはん用されている。後者は間接蛍光検出も可能である。

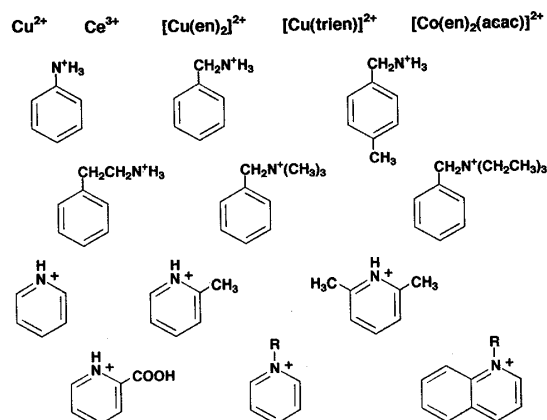


Fig. 10 Eluent ions for cation chromatography with indirect photometric detection

これらの金属イオンより更に当量吸光度が大きく、イオン交換溶出力も強い溶離剤として、かさ高いビスエチレンジアミン銅(II)錯体やトリエチレントトラミン銅(II)錯体⁶⁸⁾⁶⁹⁾、ビスエチレンジアミンアセチルアセトナートコバルト(III)錯体⁷⁶⁾が報告されている。一方、有機陽イオン性溶離剤では、アニリン、ベンジルアミン⁷⁷⁾⁷⁸⁾、ベンジルトリメチルアンモニウム⁷⁷⁾⁷⁹⁾⁸⁰⁾、ベンジルトリエチルアンモニウム⁷⁹⁾、フェニルエチルアミン⁷⁶⁾、ピコリン酸⁷⁸⁾、メチルピリジン⁸¹⁾、ジメチルピリジン⁸²⁾などの芳香族アミンやピリジニウム塩が用いられる。これらの溶離剤のなかには無機陽イオンだけでなく、アルキルアミン類、あるいはグアニジン類の分析に応用されているものもある⁸³⁾。

以上の溶離剤を用いた報告の多くは、スチレンジビニルベンゼン共重合体にスルホン基を結合した陽イオン交換樹脂カラムが用いられているが、この分析カラムは一価陽イオンの保持に比べてアルカリ土類金属イオンなどの二価陽イオンの保持が非常に強い。このため両者の分析には、それぞれ異なる濃度の溶離液が必要であった。一方、シリカゲル担体にスルホン基を結合した陽イオン交換体カラムを用いて、これらの一斉分析が前述の硫酸銅(II)の単一溶離液で達成されている (Fig. 11)⁸⁴⁾。その後、シリカゲル担体にブタジエン-マレイン酸を結合した陽イオン交換体カラムで、更に優れた分離が報告された⁸⁵⁾。又、溶離液にアルカリ土類金属イオンとの錯体形成能を持たせたベンジルアミン-クエン酸-エチレンジアミン四酢酸銅(II)やジ-ヘプチル-4,5'-ビピリジニウムクエン酸-クエン酸を用いた一価、二価陽イオンの同時分析が報告された (Fig. 12)⁸⁶⁾。

さて、溶離剤の陽イオン成分と陰イオン成分のいずれ

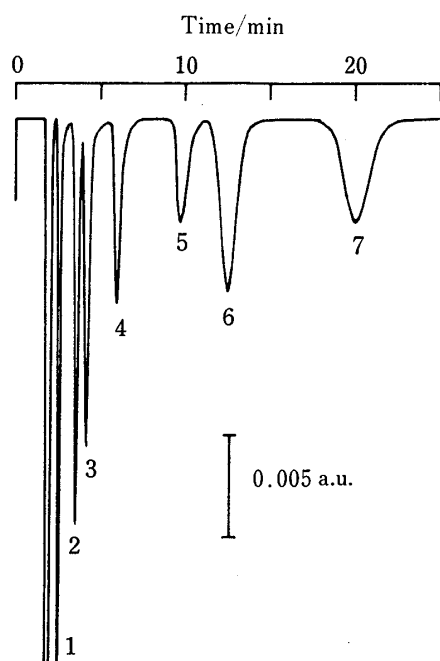


Fig. 11 Chromatogram of inorganic cations⁸⁴⁾

Column: Zipax SCX; Eluent: 2.5 mM CuSO_4 ; Detection: 220 nm. Peaks: 1, Na^+ ; 2, NH_4^+ ; 3, K^+ ; 4, Rb^+ ; 5, Cs^+ ; 6, Mg^{2+} ; 7, Ca^{2+} (each 40 nmol)

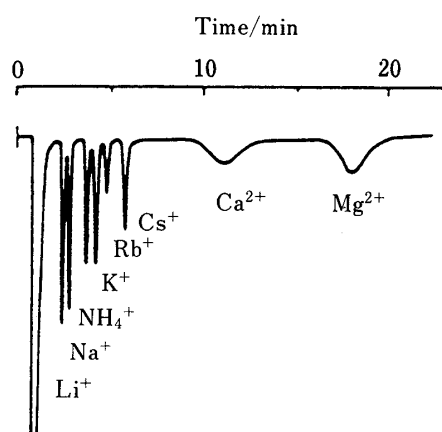


Fig. 12 Chromatogram of inorganic cations⁸⁶⁾

Column: Sulfonated St-DVB; Eluent: 5 mM benzylamine-0.475 mM EDTAOH-1.425 mM citric acid (pH 6.6); Detection: 257 nm; Sample: each 10 nmol except for Rb^+ (5 nmol)

にも紫外吸収を保有させることによって、陽イオンと陰イオンの同時分析が試みられている。例えば、陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムの2本を直列に連

結して *o*-スルホ安息香酸-銅(II) 溶離液を流し、陽イオンと陰イオンが異なる二波長で同時検出されている⁸⁷⁾。又、陽イオン交換基と陰イオン交換基の両方を有する充てん剤、もしくは陽イオン交換体と陰イオン交換体を混合充てんしたカラムに、硝酸セリウム(III) あるいはベンジルトリメチルアンモニウム-*p*-トルエンスルホン酸溶離液を用いた同時分析も報告されている⁸⁸⁾。

4・1・4 検出器と検出感度 式(6)で述べたように、本法のノイズの大きさは溶離液の吸光度に依存するが、定数 K の大きさは吸光度検出器により大きな差があるため²⁾、市販の検出器のノイズやダイナミックレンジ、ドリフトを比較した報告⁸⁹⁾や、蛍光検出用に開発した光ダイオードを用いて検出感度の向上を図った報告⁹⁰⁾が見られる。一方、吸光度が1を超えない範囲で検出を行うために、溶離液濃度によっては検出波長を吸収極大波長から長波長側、又は短波長側に移動してこの条件を満たす必要がある。

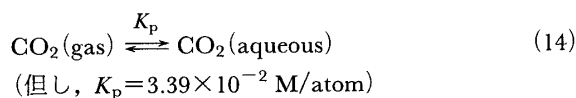
ところで、感度の観点から間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーと電気伝導度検出イオンクロマトグラフィーの検出下限が比較されている。間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーの溶離液にフタル酸塩を使用したとき、主な無機陰イオンと有機酸の検出下限は数~数十 pmol 程度と報告されている⁹¹⁾⁹²⁾。同じ溶離液条件で電気伝導度検出と間接吸光度検出方式を比較すると、強酸性陰イオンは前者のほうが、有機酸のような弱酸類は後者のほうが優れていた⁵⁹⁾。同様に、有機リン酸エステルについても間接吸光度検出のほうが約 50 倍優れていた⁹³⁾。又、フタル酸水素カリウム溶液を共通溶離液としたとき、無機陰イオンの検出感度はいずれも間接吸光度検出が優れていると報告されている³⁰⁾⁹⁴⁾。そのほか、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸や 6,7-ジヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸を共通溶離液として、両検出法の感度が比較されている³²⁾。

前述したように、間接吸光度検出法の感度は溶離剤のイオン交換溶出力が強くて、当量吸光度が大きいほど向上する⁸⁹⁾。これに基づいて、ナフタレンジスルホン酸やナフタレントリスルホン酸を溶離液として、特に保持の強い陰イオンの検出感度向上が図られている^{59)~64)}。ナフタレントリスルホン酸を用いると、間接吸光度検出による硫酸イオン、チオ硫酸イオン、二チオン酸イオン、チオシアン酸イオンなどの検出下限は電気伝導度検出の数十分の一であり⁶⁵⁾、ナフタレンジスルホン酸を用いると、陰イオン界面活性剤 ($\text{C}_6\sim\text{C}_{12}$ スルホン酸及び硫酸エステル) の検出下限は電気伝導度検出の 2~4 分の 1 であると報告されている⁹⁵⁾。

一方, 硫酸銅(II) 溶離液を用いたときの主なアルカリ金属イオンとアンモニウムイオンの間接吸光度検出による検出下限は数十～数百 pmol と報告されている⁸⁴⁾. メチルピリジン, ジメチルピリジン, ベンジルアミン, 2-フェニルエチルアミン及び 4-メチルベンジルアミンなどを共通溶離液としたとき, アルカリ金属イオンとアンモニウムイオンの検出下限は, 電気伝導度検出が 0.3～6.7 ppb の範囲であったのに対して, 間接吸光度検出では 0.2～21 ppb と報告されている⁷⁸⁾⁸²⁾⁹⁶⁾. このように, 間接吸光度検出と電気伝導度検出はそれぞれに適する対象が異なり, 両者を相補的に用いることは有用である⁹⁷⁾.

4・1・5 改良システム 間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーは電気伝導度検出イオンクロマトグラフィーと同様の無機陰イオンと無機陽イオンが微量分析できるが, 更に電気伝導度検出方式を上回る幾つの特徴を持っている. その一つに, 溶離液 pH の制限がないことが挙げられる. すなわち, 間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーでは溶離液 pH を中性以上に調整することにより弱酸の解離を促進可能であり, その結果, 有機酸や炭酸などの弱酸イオンを強酸イオンと同条件, 同感度で分析できる.

大気中から溶離液に混入して微量炭酸イオンの分析を妨害する二酸化炭素を除去するために, 式(14)で示される Henry の法則を応用した溶離液の窒素パージシステムが考案され, これまでイオンクロマトグラフィーで課題とされてきた微量総炭酸(炭酸+炭酸水素イオン+炭酸イオン)の分析が可能になった (Fig. 13)⁹⁸⁾.



更に, 無機陰イオンのピークを妨害するアルカリ土類金属イオン (Fig. 14B) を陽イオン交換カラム/ハートカッティングカラムスイッチング法でインライン除去することにより, これまでイオンクロマトグラフィーで課題とされてきた降水中や河川水中の微量総炭酸が他の無機陰イオンや有機酸と同時分析可能になった (Fig. 14A)⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾.

間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーの特徴として, 次に普及型の HPLC 装置で実践可能であり, 前述のカラムスイッチング法をはじめとするシステムの組替え・接続の容易な点が挙げられる¹⁰¹⁾. 例えば, エステラーゼが中性 pH 溶離液の中で安定なことに基づいて, エステラーゼ固定化カラムを分析カラムの直前に導入することによって, 有機酸エステルの分析が報告されてい

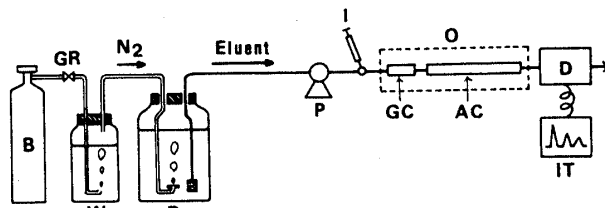


Fig. 13 Indirect photometric detection ion chromatographic system for determination of carbonate-carbon⁹⁸⁾

B: nitrogen gas bomb; GR: gas regulator; W: gas washing bottle; R: eluent reservoir; P: pump; I: injector; O: column oven; GC: guard column; AC: analytical column; D: UV detector; IT: integrator

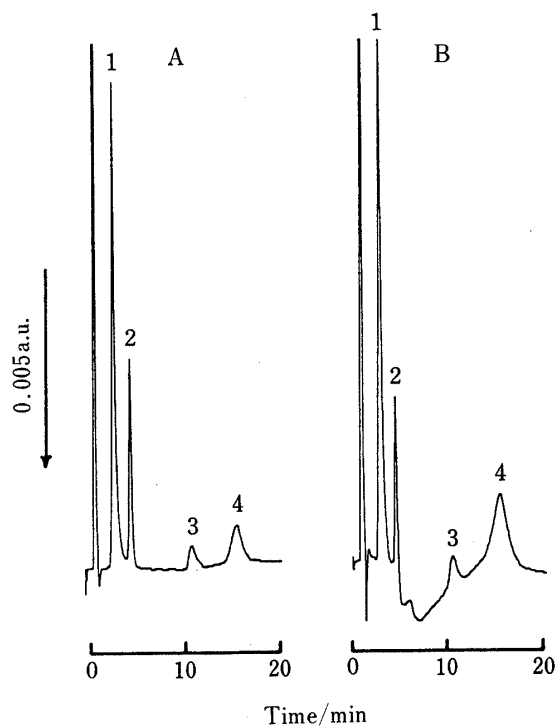


Fig. 14 Chromatogram of river water⁹⁹⁾

Removal column: MCI GEL CK-10S; Analytical column: MCI GEL SCA-03; Eluent: 1 mM phthalic acid-0.15 mM HEPES (pH 7); Detection: 260 nm. Peaks: 1, HCO_3^- (12 nmol); 2, Cl^- (3 nmol); 3, NO_3^- (1.2 nmol); 4, SO_4^{2-} (1 nmol)

る (Fig. 15)¹⁰²⁾. 又, 濃縮カラムを流路切り換えバルブを挟んで試料注入器の直後に導入することにより, ppt レベルの有機酸と無機陰イオンの高感度同時分析システムが考案され¹⁰³⁾, いずれも実試料の分析に効果を発揮している.

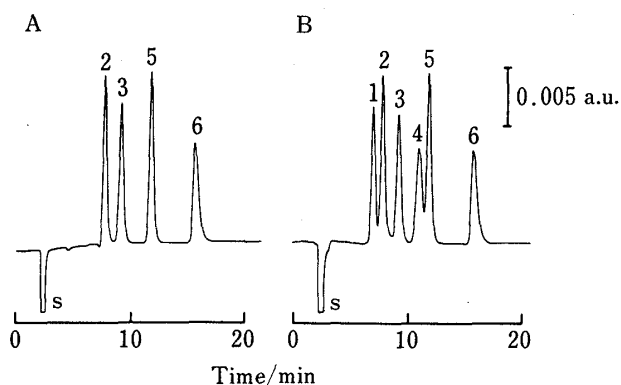


Fig. 15 Chromatograms of ethyl carboxylates, carboxylate anions and inorganic anions (B) with and (A) without carboxylesterase-immobilized column¹⁰²⁾

Analytical column: MCI SCA-02; Eluent: 1 mM phthalate-0.15 mM HEPES (pH 6.5); Detection: 280 nm. Peaks: s, system peak; 1, ethyl acetate; 2, propionate; 3, butyrate; 4, ethyl isovalerate; 5, Cl^- ; 6, NO_2^- (each 10 nmol)

ところで、間接吸光度検出イオンクロマトグラフィーでは専らアイソクラティック溶出条件が用いられており、大きなベースライン変動を伴う濃度こう配溶出法の導入は困難と考えられてきた。この問題の解決法の一つとして2種類の溶離液を切り換える方法が報告されたが、その適用範囲は限られている¹⁰⁴⁾。一方、データ処理装置の記憶演算機能を利用した差クロマトグラム法を用いることによって、溶離液の段階濃度切り換え法の導入が可能になった。すなわち、あらかじめ記憶させた試料イオンを含まないブランク試料（溶離液や蒸留水）のクロマトグラムデータを実際試料のクロマトグラムデータから減算処理する方法である。Fig. 16には、従来のアイソクラティック溶出条件では迅速分析ができなかったスチレンジビニルベンゼン共重合体にスルホン基を結合したカラムによる一価及び二価無機陽イオンの分析クロマトグラムを示した。はじめに0.01 mM 硫酸銅(II)溶離液を送液して保持の弱いナトリウム及びカリウムイオンを溶出させ、その後にステップワイズで300倍もの高濃度(3 mM)溶離液を送液して保持の強いマグネシウム及びカルシウムイオンを迅速に溶出し検出した例である。演算処理後のクロマトグラムは電気的極性を逆転させ、更に溶離液が高濃度になるときに1.024吸光度フルスケールから0.002又は0.008吸光度フルスケールに増幅してクロマトグラム表示することにより、4種類の試料イオンのピークが同時に上向きのピークとして検出される。この方法は、それぞれの溶離液濃度で得ら

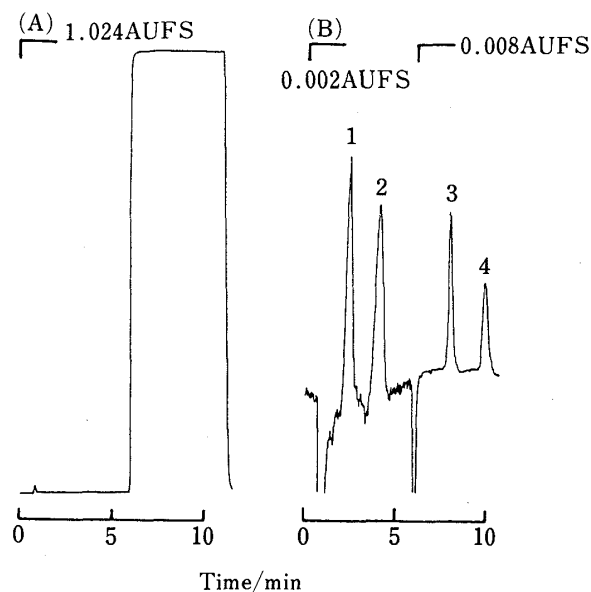


Fig. 16 Differential chromatogram of inorganic cations¹⁰⁵⁾

(A) sample chromatogram. (B) differential chromatogram obtained by subtracting blank chromatogram from sample chromatogram after amplifying and changing polarity. Column: MCI GEL SCK-01; Eluent: CuSO_4 , 0.01 mM (0~5 min), 3 mM (5~10 min), 0.01 mM (10 min~); Detection: 230 nm. Peaks: 1, Na^+ (1 nmol); 2, K^+ (1 nmol); 3, Mg^{2+} (4 nmol); 4, Ca^{2+} (4 nmol)

れる検出感度や定量範囲を変化させることなく、分析時間を大幅に短縮できるので、シングルカラムイオンクロマトグラフィーの実用性を高めることになった¹⁰⁵⁾。

4・2 イオン相互作用クロマトグラフィー

4・2・1 熱力学的平衡モデル イオン相互作用クロマトグラフィーが報告された当初は、極性電解質の非極性カラムへの保持を説明する理論として、疎水性の部分を持ったイオン（イオン相互作用試薬, IIR）が非極性のカラム固定相に吸着されて動的イオン交換体として作用するモデル¹⁰⁶⁾¹⁰⁷⁾、あるいは界面電気二重層を形成して電解質を取り込む平衡モデル¹⁰⁸⁾¹⁰⁹⁾や移動相中で電解質がIIRとイオン対を形成して固定相に取り込まれるモデル¹¹⁰⁾などが提案されていた。

近年、疎水性イオンの逆相カラムへのLangmuir吸着がStern-Gouy-Chapman理論で説明されたことを契機に、極性電解質のイオン相互作用クロマトグラフィーにおける保持機構が急速に明らかになりつつある¹¹¹⁾。更に、IIRがカラム担体表面で電気二重層を形成すること

に基づくイオン性物質の保持式が誘導された^{112)~116)}.

$$k' = k'_0 \exp(ZF\phi_0/RT) \quad (15)$$

ここで, k'_0 は IIR が存在しないときの試料成分 (イオン性物質) の保持比, Z はその価数, ϕ_0 は表面電位を表す. F , R , T はそれぞれファラデー定数, 気体定数, 絶対温度である. 又, 移動相中に共存させる有機溶媒の効果についても考察されている¹¹⁷⁾. 一方, 逆相カラムが IIR として作用する疎水性イオン種に対して二つの異なる吸着サイトを示すことも報告された¹¹⁸⁾. 更に移動相中のイオン強度が低い場合の疎水性イオンの保持には, 静電的な効果だけでなく, 疎水的な吸着も無視できないことが報告された¹¹⁹⁾. これに対して, 移動相にキレート剤を用いた多価金属イオン分析¹²⁰⁾や無機陰イオン分析におけるイオン交換系とイオン相互作用系の比較¹²¹⁾より, 動的イオン交換モデルを支持する報告もある. いずれにせよ, イオン相互作用クロマトグラフィーにおいて IIR がなんらかの機構で逆相カラムに保持された結果, 試料成分 (イオン性物質) はイオン交換様の機構で分離されると考えられる. IIR の種類, 濃度などの違いにより, 主要保持機構は異なると推察されるが, その中でもソルボボック理論の地位が低くなりつつあることは確かである¹²²⁾.

4・2・2 dynamic ion exchanger と fixed-site ion exchanger イオン相互作用クロマトグラフィーは, IIR の組成によって次の二つに大別される. 第一に, カラムの溶離剤とのなじみを良くし, 試料成分 (イオン性物質) の分離改善を目的として移動相中に有機溶媒を添加することがある. この場合, IIR を補給目的で移動相に添加しておく必要があり, これを “dynamic ion exchange 様式” と呼ぶ. これに対して, IIR を前もってカラムに吸着させておき, 移動相には溶離剤のみ (緩衝剤) を用いる方法がある. これはまさにイオン交換カラムを用いるイオンクロマトグラフィーそのものであり, これを “fixed-site ion exchange 様式” と呼ぶこともある.

イオン相互作用クロマトグラフィーがイオン交換クロマトグラフィーに優る点は, 分析カラムのイオン交換容量を任意に調節でき, しかも使用する逆相カラムはイオン交換カラムに比べてはるかに廉価なことである. 更に, dynamic ion exchange 様式では, IIR, 溶離剤のどちらか一方に光吸収を持たせるだけで間接吸光度検出が可能であり, 溶離剤選択の幅が広がる. 例えば, IIR として pH 指示薬を用いることによって, 無機陰イオン¹²³⁾, 遷位金属¹²⁴⁾や希土類金属¹²⁵⁾の可視領域での間

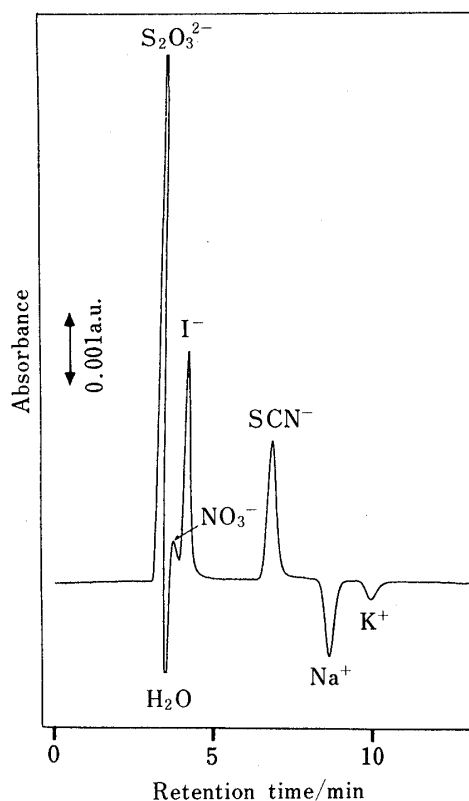


Fig. 17 Simultaneous separation of inorganic cations and anions¹³²⁾

Column: Develosil ODS-5 coated with taurodeoxycholate; Eluent: 5 mM CuSO₄; Detection: 210 nm; Analytes: Na₂S₂O₃, NaNO₂, NaNO₃, KI, NaSCN (each 0.5 mM)

接吸光度検出が報告されている.

近年はイオン相互作用クロマトグラフィーを fixed-site ion exchange 様式で利用する報告が多くなり, 四級アンモニウム塩をコーティングした分析カラムに, Fig. 6 に示したような芳香族カルボン酸^{126)~128)}や金属錯体¹²⁹⁾を用いて間接吸光度検出が行われている. 又, 胆汁酸をコーティング剤として用いて特徴のあるクロマトグラムが得られている. 例えばタウロコール酸では遊離のスルホニル基を利用したアルカリ金属イオン, アルカリ土類金属イオンの分析¹³⁰⁾¹³¹⁾はもちろん, 残ったアミド結合の持つ弱塩基性を利用して Zwitterion 型の官能基による陽, 陰両イオンの同時分析が報告された¹³²⁾. Fig. 17 には, 硫酸銅(II) 溶離液による陽, 陰両イオンの間接吸光度検出クロマトグラム例を示した. この胆汁酸はらせん構造を有することにより高分子に対してゲル濾過効果を発現して, 生体試料の直接注入によるアルカリ金属イオン, アルカリ土類金属イオンの分析も可能と

した¹³³⁾。以上のように、イオン相互作用クロマトグラフィーを液体クロマトグラフィーの変法と考える限り、間接吸光度検出法による論文が主体となる。最近、この胆汁酸コート分析カラムを使い、水を溶離液として陽、陰両イオンの同時分析が報告された^{134)~136)}。溶離液としての水は、電気伝導度検出器にとってこの上なく都合がよく、この方面での今後の展開が楽しみである。

4・3 実際試料分析

Table 1 には間接吸光度検出クロマトグラフィーを用いた実際試料分析の報告をまとめた。電気伝導度検出方式と同様に、環境水、食品、生体液、医薬品、工業製品などの実際試料中の塩化物、硝酸、硫酸などの無機陰イオンやナトリウム、アンモニウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどの無機陽イオンの分析にはん用されている。又、間接吸光度検出方式は有機酸や炭酸等の弱酸を高感度検出できることから、食品中の有機酸や環境水中の総炭酸の分析にも応用されている。更に、電気伝導度検出方式では感度が悪い亜リン酸、次亜リン酸、オルトリン酸や有機リン酸エステル、あるいは保持が強く溶出に難点があるヨウ化物、チオシアン、硫酸、ピ

ロリン酸、有機スルホン酸エステルや硫酸エステルの分析にも応用されている。

一方、陽イオンについても電気伝導度検出方式と同様にナトリウム、アンモニウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどの無機陽イオンの分析にはん用されているほか、有機アミン類の分析も報告されている。

Table 1 から分かるように、イオン交換カラムを用いた実際試料への適用例は多いのに対して、逆相カラムを用いた適用例はあまり多くない。これは、多様な共存物質により、逆相カラムによる分離や保持時間の再現性が損なわれやすいことも理由の一つとして考えられている¹³⁷⁾。このことは、イオン交換様式も含めて、試料のクリーンアップなどの前処理の重要性を意味しているが、本稿ではその内容は割愛する。実際試料分析のためのサンプリング及び前処理に関する成書¹⁵⁷⁾などを参照するのがよいであろう。

以上の研究成果に裏付けされた吸光度検出イオンクロマトグラフィーは、既に日本薬学会編「衛生試験法・注解 1990」に収載されるなど、幾つかの公定法に収載される傾向にある。

Table 1 Applications of indirect photometric detection chromatography

Analyte (sample matrix)	Eluent	Column	Detect/ nm	Ref.
H ₂ PO ₄ ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ (river water, atmospheric pollutant)	1 ~ 5 mM orthophthalate (pH 3.5 ~ 5.2) 0.3 ~ 0.5 mM Isophthalate (pH 4.6 ~ 5.2)	Nucleosil 10-SB Vydac 302 IC	251~298	50
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ (rain water, river water, tap water, mineral water, vegetable)	0.5 mM disodium phthalate	Zipax SAX	240	91, 138, 139
BrO ₃ ⁻ (<i>kamaboko</i>)	0.25 mM potassium hydrogenphthalate-0.25 mM boric acid	Zipax SAX	230	140
ClO ₃ ⁻ (candy)	0.5 mM disodium phthalate	ASA-4000	250	141
Cl ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ (aqueous infusion)	1 mM disodium phthalate (pH 10)	ASA-4000	260	142
Cephalotin; SO ₄ ²⁻	1 mM potassium hydrogenphthalate-0.75 mM borate	Dionex AS-1	250	143
SO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ (by-product, water)	2 mM phthalate (pH 5.6)	Vydac SBAX	265	144
Cl ⁻ , SO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ (pharmaceutical sample)	1 mM potassium hydrogenphthalate-0.75 mM sodium borate (pH 9.1)	Dionex AS-1 + suppressor	255	145
Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HPO ₄ ²⁻ , CH ₃ OSO ₃ ⁻ (herbicide)	3 mM potassium hydrogenphthalate	Vydac 3021C anion exchanger	290	146

Analyte (sample matrix)	Eluent	Column	Detect/ nm	Ref.
F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , ascorbate, malonate, tartrate, oxalate (river water, tap water, city water)	1.2 mM phthalate (pH 6.0), 0.2 mM benzenetricarboxylate (pH 6), 0.02 mM pyromellitate (pH 7)	anion exchanger	220~270	55
Lactate, ascorbate, Cl ⁻ , maleate, tartrate, citrate (soft drink)	10 mM citraconic acid (pH 6.8) → 1 mM <i>m</i> -sulfo benzoic acid (pH 6.8)	MCI SCA-01	254	104
HPO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , uric acid, SCN ⁻ , maleate, naphthyl-sulfonate (environmental sample, body fluid, drug)	4 mM citric acid-0.1 mM cetrimide (pH 5.5)/methanol	silica based SAX	210~230	27
Carboxylic acids: acetic, lactic, gluconic, succinic, pyroglutamic (vinegar)	0.45 mM <i>o</i> -aminobenzenesulfonic acid (pH 3.5)	TSKgel IC-Anion-PW	302	40
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ (rain water)	mono-, di-, tribenzenecarboxylic acids; mono-, dinaphthalene sulfonic acids	TSKgel IC-Anion-SW	240~310	64
H ₂ PO ₄ ⁻ (saline sediment)	0.3 mM potassium hydrogenphthalate/acetonitrile, 0.1 mM 1,5-naphthalenesulfonate/acetonitrile	Waters IC-Pak A	285	153
Sulfonates, sulfates of C ₆ ~C ₁₂ (industrial sample, shampoo)	0.2 mM 1,5-naphthalenedisulfonate/acetonitrile	fluoropolymeric weak anion silica	285	95
Phytic acid (food)	0.3 mM Naphthalen-1,3,6-trisulfonic acid (pH 5.5)	Shim-pack IC-AI	295	66
Pyrophosphate, trimetaphosphate, tripolyphosphate, tetrapolyphosphate, NTA, EDTA, citrate (soft drink)	0.1~0.2 mM 1,3,6-naphthalenetrisulfonate/acetonitrile	Hamilton PRP-X100	280	67
D-, L-Malic acid (juice)	1.5 mM Cu(OH) ₂ -3 mM L-tartrate (pH 4.8)	TSKgel IC-Anion-PW	281~283	73, 74
Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (rain water, river water, tap water, mineral water, vegetable)	2.5 mM CuSO ₄	Zipax SCX	220	91, 138, 139
Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (tap water)	2.5 mM CuSO ₄	Zipax SCX	220	84
Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (aqueous infusion)	0.1~2 mM CuSO ₄	ASC-4000	220	142
Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (river water)	1 mM CuSO ₄	TSKgel IC-cation+ Zipax SCX	225	101
Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (city water)	0.1 mM Ce ₂ (SO ₄) ₃	ION-210	254	75
Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (tear)	0.05 mM Ce ₂ (SO ₄) ₃	Merk Polysphere IC CA	254	147
Li ⁺ , Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (river water, milk, mineral water)	5 mM benzylamine-0.475 mM EDTAOH-1.425 mM citric acid (pH 6.6) 1 mM 1,1'-diheptyl-4,5'-bipyridinium citrate-1 mM citric acid (pH 4.3)	TSKgel IC-cation-SW	257 300	86

Analyte (sample matrix)	Eluent	Column	Detect/ nm	Ref.
Cl^- (tear)	0.5 mM potassium hydrogenphthalate-53 mM ethyleneglycol/2-propanol	Polysphere IC AN	260	147
F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} (tap water)	0.7 mM potassium hydrogenphthalate-0.1 mM sodium tetraborate-0.5 mM boric acid-0.1 mM HEPES-0.05 mM sodium hydrogencarbonate-5% butanol (pH 7.3)	TSKgel IC-Anion-PW	265	148
HCO_3^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} (river water)	10 mM phthalic acid-0.15 mM HEPES (pH 7)	MCI GEL CK-10S (removal column) + MCI GEL SCA-03 (analytical column)	260	99
Acetate, lactate, formate, levulinate, Cl^- , NO_2^- , HPO_4^{2-} , succinate, maleate, tartrate, SO_4^{2-} (wine, beer, <i>sake</i>)	0.5 mM disodium phthalate	MCI SCA-01	240	92
3-Hydroxybutyrate, lactate, pyruvate, acetoacetate, Cl^- , NO_3^- (serum)	1 mM potassium hydrogenphthalate	Partisil 10SAX	296	10
F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , acetate, formate, HCO_3^- , propionate (natural water)	0.8 mM potassium hydrogenphthalate (pH 6.8)	Hamilton PRP-X100	265	149
H_2PO_4^- , Cl^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , lactate, acetate (pharmaceutical samples)	0.2~2 mM potassium hydrogenphthalate (pH 4.11~9.1)	Dionex AS-1, Wescan 269-001, Vydac #3021C	233~250	150
Oxalate (pharmaceutical sample)	1 mM potassium hydrogenphthalate-2 mM borate (pH 9.1)	Dionex AS-1	250	151
Carbonate-carbon (rain water, tap water, river water)	0.5 mM sodium hydrogenphthalate-0.15 mM HEPES (pH 6.5), purged with N_2	MCI SCA-02	250	98
Methylphosphate, ethylphosphate, propylphosphate, butylphosphate (plasma)	0.4 mM dipotassium phthalate (pH 8.5)	Waters IC-Pak Anion LC	272	93
Acetate ester, HCO_3^- , propionate ester, butyrate ester, isovalerate ester (flavor, food, additive)	1 mM phthalate-0.15 mM HEPES (pH 6.5)	carboxylesterase immobilized column + MCI SCA-02 analytical column	280	102
Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- (river water)	0.4 mM 1,2,4-benzenetricarboxylic acid (pH 7.5)	TSKgel IC-Anion-PW	258	51
HCO_3^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} (river water)	0.4 mM 1,2,4-benzenetricarboxylic acid (pH 7)	TSKgel IC-Anion-PW	270	152
F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, I^- , acrylate, methacrylate, maleate, fumarate (vegetable, city water)	0.55~5 mM pyromellitic acid (pH 4~5.5) 3 mM pyromellitic acid (pH 6.1)	Hamilton PRP-X100 Ionosphere A	307~331 296	54

Analyte (sample matrix)	Eluent	Column	Detect/ nm	Ref.
Methylamine, dimethylamine, ethylamine, trimethylamine, diethylamine, triethylamine (soil)	10 mM CuSO ₄	Aminex A-8, A-9	240	154
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HPO ₄ ²⁻ , SCN ⁻ (river water, snow, drink, saliva)	1 mM EDTA (pH 6)	TSKgel IC-Anion-SW	210	28
Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (rain water, river water, tap water)	0.2 mM pyromellitic acid (pH 5.5)	TSK QAE-SW	262	56
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (river water, tap water, hot spring)	0.1 mM 1,5-naphthalenedisulfonic acid-0.05 mM EDTA (pH 6)	TSKgel IC-Anion-PW	286	63
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (tap water)	1 mM phthalate-6 mM EDTA (pH 6.57)	Shim-pack WAX-1	280	71
NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , ClO ₃ ⁻ (explosive)	4 mM benzyltributylammonium-0.14 mM hexane sulfonic acid-7 mM phosphate buffer (pH 5)	LiChrospher RP-18	262	155
Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ (rain water, aerosol)	8 mM tetrabutylammonium-1 mM phthalate (pH 6)	Partisil 10 ODS-3RP	UV	156
Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ (river water, tap water, sea water, rain water)	0.4 mM tetrabutylammonium-0.5 mM 1,5-naphthalene disulfonic acid	TSK gel ODS-80TM	300	121
NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ (ground water)	0.5 mM 1,3,5-benzene tricarboxylic acid (pH 6.8)	Supercosil LC-18-DB coated with cetyltrimethylammonium	254	126
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (wine, beverage, well, tap water)	0.1 mM CeCl ₃	Develosil ODS-5 coated with taurocholate	253	131
F ⁻ (urine)	0.8 mM nicotinate-0.01 mM urate (pH 9)	Capcell pack C18 coated with cetyldimethylbutylammonium	245	127

5 偏光吸光度検出法

5・1 偏光吸光度検出法の原理

光学異性体が存在するとき、その違いによって薬効や毒性が異なることがある。このため、医薬品のみならず食品添加物についても光学異性体分析の重要性が増している。クロマトグラフィーによる光学異性体分析法に関するこれまでの研究は、ジアステレオマーへの誘導化試薬や光学活性固定相の開発を中心に進められてきた。しかし、これらの方法は誘導化に伴う煩雑さや多岐にわたる固定相の選択などの欠点を有している。これに対して、検出器側からの研究は、光学活性物質による旋光現象に基づくファラデー方式の旋光計が市販されているも

の、感度や操作性の点で満足できるものではない。最近、光学活性物質による旋光現象を透過光の強度変化に変換する偏光吸光度検出法が提案された¹⁵⁸⁾。これは、吸光度の増加と減少の両方を検出情報とする前述の示差吸光度検出法を更に旋光現象に応用発展させた原理とすることができる。

本原理に基づく光学系の概略を Fig. 18 に示したが、フローセルの直後に偏光子を配置している。光源からの光（偏光）がフローセルを通過するとき、この中に光学活性物質が存在すると、それに由来して透過光の偏光面が回転する。偏光子を通過する透過光の強度はその偏光面と偏光子軸の成す角度に依存して決まる。基本光学系として普及型の紫外・可視吸光度検出器を用いると、光

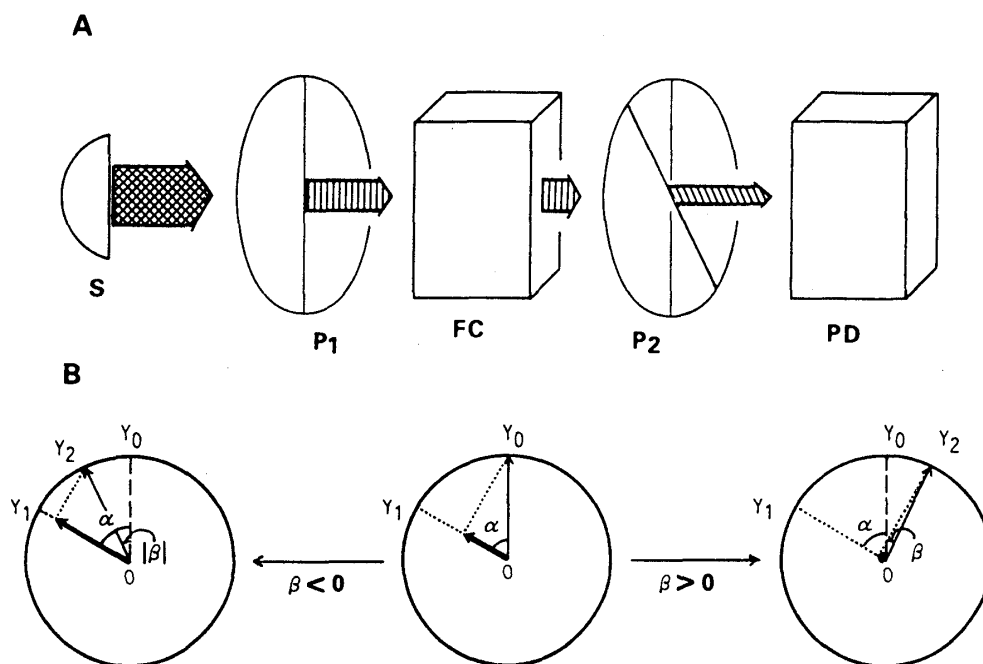


Fig. 18 Operation principles of polarized photometric detector¹⁵⁹⁾

(A) schematic construction: S, light source; P₁, P₂, polarizers; FC, flow cell; PD, photodiode. (B) vector diagram of transmitted light

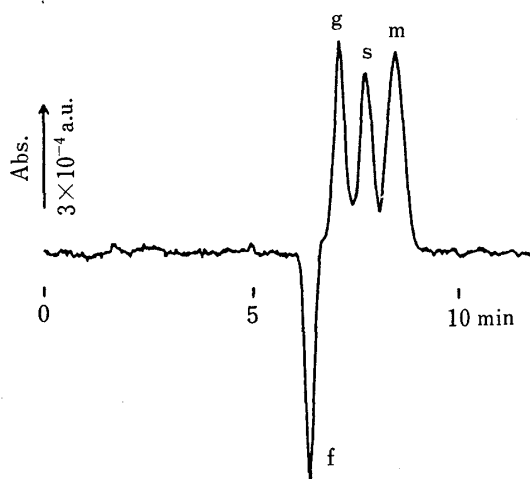


Fig. 19 Chromatogram of sugars¹⁵⁸⁾

Column: TSKgel Amide 80; Mobile phase: ethanol/water (1:4); Detection: 490 nm. Peaks: f, fructose (3.3 μ mol); g, glucose (2.8 μ mol); s, sucrose (0.9 μ mol); m, maltose (1.1 μ mol)

源は自然光であるので、フローセルの直前にもう1枚偏光子を挿入して偏光光源を得ることにより、この原理が適用できる。このとき、吸光度の変化量 (Δ Abs) と旋光度 (β) の間に式(16)が成立することが導き出され

た¹⁵⁹⁾。

$$\Delta \text{Abs} = 2 \log e \cdot \tan \alpha \cdot \beta \quad (16)$$

ここで、 α は2枚の偏光子の位相間角度 ($|\alpha| \gg |\beta|$) を表す。

5・2 偏光吸光度検出器

普及型の紫外・可視吸光度検出器を基にして上述の基礎理論を応用した偏光吸光度検出器が試作された。この検出器は、数 μ l という少ない試料量で、左、右旋光の区別とその角度を測定できる。Fig. 18のように1枚目(光源側)の偏光子軸に対して2枚目(受光器側)の偏光子軸をあらかじめ(受光器から見て)左に α 回転したとき、式(16)より左旋光性物質($\beta < 0$)は吸光度の減少($\Delta \text{Abs} < 0$)を生じ、右旋光性物質($\beta > 0$)は吸光度の増加($\Delta \text{Abs} > 0$)を生ずる。Fig. 19には本検出器による左旋光性の果糖及び右旋光性のブドウ糖、ショ糖、麦芽糖の分析クロマトグラム例を示している¹⁵⁸⁾。

この試作器の α を 45° に定め、更に検出波長を500~600 nmとした(最大SN比を与える波長領域)とき、約 7.5×10^{-5} の検出下限($S/N=3$)が得られている。理論式によれば、 S/N は光源強度を増すほど、又セル長(光路長)を長くするほど改善されるが、高感度

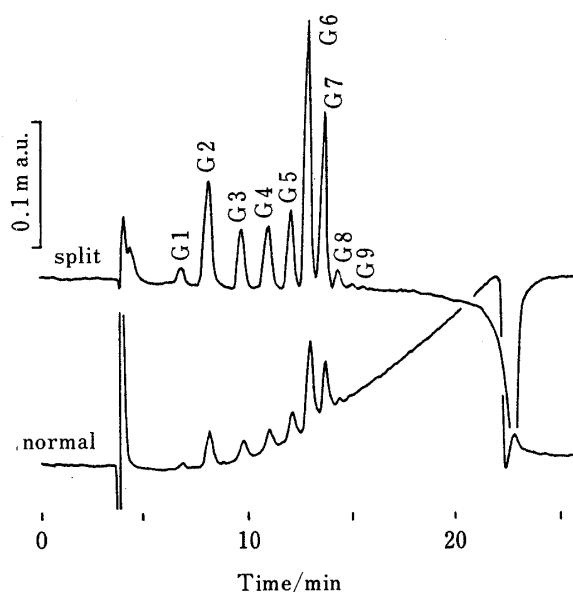


Fig. 20 Chromatogram of mono-, di- and oligo-saccharides¹⁶⁰⁾

Column: TSK gel Amide 80; Mobile phase: acetone/water (2+1 to 1+2 over 15 min); Detection: 530 nm. Peaks: G1, glucose; G2, maltose; G3~9, maltotriose and higher saccharides with numbers indicating degree of polymerization

領域では従来のシングル型フローセルの内径を広げていくと示差屈折効果に伴うノイズピークが生じて感度向上を妨げるようになる。この問題点の改善を目的として、流路を二分したスプリット型フローセルが試作され、これを用いて濃度こう配溶出条件を用いたモノ、ジ、オリゴ糖の一斉分析が報告された (Fig. 20)¹⁶⁰⁾。これらの基礎研究の成果に基づいて、より高性能な専用偏光吸光度検出器の開発研究が著者らにより進行中である。

5・3 偏光吸光度検出法の応用

偏光吸光度検出法の光学活性物質に対する高い選択性は、実際試料分析のための前処理が簡素化できる点で有利である。既に、本法はキャンディーなどの食品に甘味料として添加されるパラチノースの分析¹⁶¹⁾や食品に添加された D-リンゴ酸及び D-酒石酸の検出に応用されて効果を発揮している¹⁶²⁾。

6 おわりに

吸光度検出法は液体クロマトグラフィーにおいて最も利用されている光学検出法であり、既にその原理のみならず検出器についても十分に完成されたものと考えられていた。しかし、吸光度の増加と減少のいずれもが検出

情報であることを示す示差吸光度検出法の原理は従来からの吸光度検出法の固定概念を変革し、イオンクロマトグラフィーの領域で大きく花開いた。更に、旋光現象にも応用されて偏光吸光度検出法を生んだ。本総説は主にこの二つに焦点を合わせたが、この古くて新しい吸光度検出法は、今後も変身を遂げながら、これまでの既成概念を超えた対象の新規光学検出法として登場する期待を抱かせてくれる。

本総説の執筆にあたり、貴重な御助言をいただいた金沢大学薬学部衛生化学教室宮崎元一教授に深謝致します。

文 献

- 1) 宮崎元一, 早川和一: “新しいイオンクロマトグラフィーの手ほどき—吸光度検出法の活用—”, (1986), (南江堂).
- 2) 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **34**, 210 (1988).
- 3) 早川和一, 宮崎元一: ぶんせき (*Bunseki*), **1991**, 11.
- 4) 宮崎元一編: “わかりやすい高速液体クロマトグラフィー”, (1991), (廣川書店).
- 5) 早川和一: 薬学雑誌, **114**, 669 (1994).
- 6) 本水昌二: ぶんせき (*Bunseki*), **1983**, 101.
- 7) 村野健太郎: ぶんせき (*Bunseki*), **1983**, 919.
- 8) P. R. Haddad, A. L. Heckenberg: *J. Chromatogr.*, **300**, 357 (1984).
- 9) G. Schmucklen: *J. Chromatogr.*, **313**, 47 (1984).
- 10) M. H. Gaffney, M. Cooke: *Anal. Proceed.*, **22**, 25 (1985).
- 11) 早川和一, 山本 敦, 宮崎元一: ぶんせき (*Bunseki*), **1991**, 358.
- 12) 早川和一, 山本 敦, 宮崎元一: 衛生化学, **40**, 1 (1994).
- 13) J. P. Hummel, W. J. Dreyer: *Biochem. Biophys. Acta*, **63**, 530 (1962).
- 14) G. F. Fairclough, J. S. Fruton: *Biochemistry*, **5**, 673 (1966).
- 15) L. L. Kastenschmidt, J. Kastenschmidt, E. Helmerich: *Biochemistry*, **7**, 3590 (1968).
- 16) A. A. Zhukhovitski, N. M. Turkel'taub: *Dokl. Acad. Nauk USSR*, **143**, 646 (1961).
- 17) R. P. W. Scott, C. G. Scott, P. Kucera: *Anal. Chem.*, **44**, 100 (1972).
- 18) T. Gnanasambandan, H. Freiser: *Anal. Chem.*, **53**, 909 (1981).
- 19) J. E. Parkin: *J. Chromatogr.*, **287**, 457 (1984).
- 20) T. Takeuchi, S. Watanabe, K. Murase, D. Ishii: *Chromatographia*, **25**, 107 (1988).
- 21) T. Takeuchi, K. Murase, D. Ishii: *J. Chromatogr.*, **445**, 139 (1988).
- 22) G. Schill, J. Crommen: *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **6**, 111 (1987).
- 23) J. Crommen, G. Schill, P. Herne: *Chromatographia*, **25**, 397 (1988).
- 24) B. Agnus, N. M. Gosselet, B. Seville: *J. Chromatogr. A*, **663**, 27 (1994).

- 25) B. A. Bidlingmeyer, S. N. Deming, W. P. Price, Jr., B. Sachok, M. Petrussek: *J. Chromatogr.*, **186**, 419 (1979).
- 26) H. Small, T. E. Miller: *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 27) B. B. Wheals: *J. Chromatogr.*, **262**, 61 (1983).
- 28) S. Matsushita: *J. Chromatogr.*, **312**, 327 (1984).
- 29) T. Okada, T. Kuwamoto: *J. Chromatogr.*, **325**, 327 (1985).
- 30) P. R. Haddad, A. L. Heckenberg: *J. Chromatogr.*, **252**, 177 (1982).
- 31) P. R. Haddad, C. E. Cowie: *J. Chromatogr.*, **303**, 321 (1984).
- 32) K. Jurkiewicz: *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 2145 (1989).
- 33) T. Takeuchi, M. Murayama, D. Ishii: *Chromatographia*, **25**, 1072 (1988).
- 34) K. Bachmann, K.-H. Blaskowitz: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **333**, 15 (1989).
- 35) S. Hjerten, K. Elenbring, F. Kilar, J.-L. Liao, A. J. C. Chen, C. J. Siebert, M.-D. Zhu: *J. Chromatogr.*, **403**, 47 (1984).
- 36) L. Gross, E. S. Yeung: *J. Chromatogr.*, **480**, 169 (1989).
- 37) D. R. Jenke: *Anal. Chem.*, **56**, 2468 (1984).
- 38) 宮崎元一, 早川和一: *Jasco LC Family*, **21** (1), 1 (1986).
- 39) A. Yamamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, **482**, 145 (1989).
- 40) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *Eisei Kagaku*, **36**, 332 (1990).
- 41) K. Hayakawa, A. Kato, A. Yamamoto, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **8**, 25 (1992).
- 42) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, **644**, 183 (1993).
- 43) T. B. Hoover: *Sep. Sci. Technol.*, **17**, 295 (1982).
- 44) A. Yamamoto, K. Hayakawa, A. Matsunaga, E. Mizukami, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, **627**, 17 (1992).
- 45) M. Nishimura, M. Hayashi, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **10**, 321 (1994).
- 46) 早川和一, 平木博美, 宮崎元一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **32**, 504 (1983).
- 47) M. C. Mehra, C. Pelletier: *Anal. Sci.*, **6**, 431 (1990).
- 48) H. J. Cortes, T. S. Stevens: *J. Chromatogr.*, **295**, 269 (1984).
- 49) T. A. Walker, T. V. Ho, N. Akbari: *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 1351 (1991).
- 50) P. J. Naish: *Analyst* (London), **109**, 809 (1984).
- 51) 本水昌二, 沢谷郁夫, 弘中孝志, 大島光子, 桐栄恭二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 77 (1987).
- 52) 太田一徳, 原田浩幸, 中嶋重旗, 田中一彦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, 141 (1992).
- 53) 三浦恭之, 康 智三: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, 331 (1992).
- 54) A. Jardy, M. Caude, A. Diop, C. Curvale, R. Rosset: *J. Chromatogr.*, **439**, 137 (1988).
- 55) Y. Miura, J. S. Fritz: *J. Chromatogr.*, **482**, 155 (1989).
- 56) 太田一徳, 加藤鉄也, 森川 久, 田中一彦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 145 (1994).
- 57) H. Sato: *Anal. Chim. Acta*, **206**, 281 (1988).
- 58) P. E. Jackson, P. R. Haddad: *J. Chromatogr.*, **355**, 87 (1986).
- 59) 中村誠治, 今泉範子, 早川和一, 宮崎元一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 573 (1989).
- 60) S. A. Maki, N. D. Danielson: *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 537 (1990).
- 61) S. A. Maki, N. D. Danielson: *Anal. Chem.*, **63**, 699 (1991).
- 62) S. A. Maki, N. D. Danielson: *J. Chromatogr.*, **542**, 101 (1991).
- 63) 本水昌二, 大島光子, 弘中孝志: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **40**, 355 (1991).
- 64) S. Motomizu, M. Oshima, T. Hironaka: *Analyst* (London), **116**, 695 (1991).
- 65) S. A. Maki, N. D. Danielson: *Chromatographia*, **33**, 25 (1992).
- 66) 松永明信, 山本 敦, 水上英一: 日本食品衛生学雑誌, **29**, 408 (1988).
- 67) S. A. Shamsi, N. D. Danielson: *J. Chromatogr. A*, **653**, 153 (1993).
- 68) K. Hayakawa, T. Sawada, K. Shimbo, M. Miyazaki: *Anal. Chem.*, **59**, 2241 (1987).
- 69) K. Hayakawa, M. Miyazaki: *LC·GC*, **6**, 508 (1988).
- 70) G. Schwedt, B. Kondratjonok: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **332**, 855 (1989).
- 71) J. Gao, H. Bian, J. Hou, J. Kang: *J. Chromatogr. A*, **657**, 95 (1993).
- 72) I. N. Voloschik, M. L. Litvina, B. A. Rudenko: *J. Chromatogr. A*, **671**, 249 (1994).
- 73) A. Yamamoto, K. Hayakawa, A. Matsunaga, E. Mizukami, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **7**, 149 (1991).
- 74) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, **585**, 315 (1991).
- 75) J. H. Sherman, N. D. Danielson: *Anal. Chem.*, **59**, 490 (1987).
- 76) C. A. Chang, Q. Wu, C. Sheu: *J. Chromatogr.*, **404**, 282 (1987).
- 77) J. R. Larson, C. D. Pfeiffer: *J. Chromatogr.*, **259**, 519 (1983).
- 78) R. C. Foley, P. R. Haddad: *J. Chromatogr.*, **366**, 13 (1986).
- 79) J. R. Larson, C. D. Pfeiffer: *Anal. Chem.*, **55**, 393 (1983).
- 80) D. L. McAleese: *Anal. Chem.*, **59**, 541 (1987).
- 81) R. C. Foley, P. R. Haddad: *Chem. Australia*, **1987**, 414.
- 82) P. R. Haddad, R. C. Foley: *Anal. Chem.*, **61**, 1435

- (1989).
- 83) T. A. Walker: *J. Chromatogr.*, **466**, 438 (1989).
 - 84) M. Miyazaki, K. Hayakawa, S.-G. Choi: *J. Chromatogr.*, **323**, 443 (1985).
 - 85) D. Yan, G. Schwedt: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **338**, 149 (1990).
 - 86) H. Sato: *J. Chromatogr.*, **469**, 339 (1989).
 - 87) Z. Iskandarani, T. E. Miller, Jr.: *Anal. Chem.*, **57**, 1591 (1985).
 - 88) D. J. Pietrzyk, S. M. Senne, D. M. Brown: *J. Chromatogr.*, **546**, 101 (1991).
 - 89) Y. Yokoyama, H. Sato: *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 561 (1988).
 - 90) A. Berthod, M. Glick, J. D. Winefordner: *J. Chromatogr.*, **502**, 305 (1990).
 - 91) 早川和一, 平木博美, 宮崎元一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **34**, T71 (1985).
 - 92) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **31**, 317 (1985).
 - 93) G. A. Pianetti, L. M. Moreira de Campos, P. Chaminade, A. Baillet, D. Baylocq-Ferrier, G. Mahuzier: *Anal. Chim. Acta*, **284**, 291 (1993).
 - 94) R. A. Cochrane, D. E. Hillman: *J. Chromatogr.*, **241**, 392 (1982).
 - 95) S. A. Maki, J. Wangsa, N. D. Danielson: *Anal. Chem.*, **64**, 583 (1992).
 - 96) 青木豊明: ぶんせき (*Bunseki*), **1990**, 303.
 - 97) 西村雅之, 今道仙也, 三上 博: 第4回イオンクロマトグラフィー討論会講演要旨集, p. 32 (1987).
 - 98) K. Hayakawa, S. Kitamoto, N. Okubo, S. Nakamura, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, **481**, 323 (1989).
 - 99) K. Hayakawa, K. Nomura, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **7**, 967 (1991).
 - 100) 早川和一, 能村京子, 宮崎元一: ぶんせき (*Bunseki*), **1993**, 375.
 - 101) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: 日化, **1986**, 1046.
 - 102) K. Hayakawa, S. Nakamura, K. Inaki, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **5**, 691 (1989).
 - 103) K. Hayakawa, J. Kobayashi, M. Ohmori, M. Ohya, A. Kato, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **9**, 419 (1993).
 - 104) 山本 敦, 松永明信, 牧野正雄, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **32**, 174 (1987).
 - 105) 綿谷敏彦, 早川和一, 能村京子, 宮崎元一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 817 (1994).
 - 106) J. C. Kraak, K. M. Jonker, J. F. K. Huber: *J. Chromatogr.*, **142**, 671 (1977).
 - 107) E. P. Kroeff, D. J. Pietrzyk: *Anal. Chem.*, **50**, 502 (1978).
 - 108) F. F. Cantwell, S. Puon: *Anal. Chem.*, **51**, 623 (1979).
 - 109) B. A. Bidlingmeyer: *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 525 (1980).
 - 110) W. R. Melander, C. Horvath: *J. Chromatogr.*, **201**, 211 (1980).
 - 111) H. Liu, F. F. Cantwell: *Anal. Chem.*, **63**, 993 (1991).
 - 112) J. Stahlberg: *J. Chromatogr.*, **356**, 231 (1986).
 - 113) J. Stahlberg, A. Furangen: *Chromatographia*, **24**, 783 (1987).
 - 114) J. Stahlberg, A. Bartha: *J. Chromatogr.*, **456**, 253 (1988).
 - 115) J. Stahlberg, I. Hagglund: *Anal. Chem.*, **60**, 1958 (1988).
 - 116) A. Bartha, G. Vigh, J. Stahlberg: *J. Chromatogr.*, **485**, 403 (1989).
 - 117) A. Bartha, G. Vigh, J. Stahlberg: *J. Chromatogr.*, **506**, 85 (1990).
 - 118) E. Arvidsson, L. Hackzell, G. Schill, D. Westerland: *Chromatographia*, **25**, 430 (1988).
 - 119) R. Bailey, R. M. Cassidy: *J. Chromatogr.*, **546**, 17 (1991).
 - 120) P. R. Haddad, R. C. Foley: *J. Chromatogr.*, **500**, 301 (1990).
 - 121) J. Zou, S. Motomizu, H. Fukutomi: *Analyst* (London), **116**, 1399 (1991).
 - 122) J. G. Dorsey, W. T. Cooper: *Anal. Chem.*, **66**, 857A (1994).
 - 123) T. A. Walker: *J. Chromatogr.*, **546**, 199 (1991).
 - 124) T. A. Walker: *J. Chromatogr.*, **602**, 97 (1992).
 - 125) T. A. Walker: *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 1573 (1993).
 - 126) D. J. Barkley, L. A. Bennet, J. R. Charbonneau, L. A. Pokrajac: *J. Chromatogr.*, **606**, 195 (1992).
 - 127) Y. Michigami, Y. Kuroda, K. Ueda, Y. Yamamoto: *Anal. Chim. Acta*, **274**, 299 (1993).
 - 128) Y. Michigami, K. Ueda: *J. Chromatogr. A*, **663**, 255 (1994).
 - 129) T. Groh, K. Bachmann: *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 2611 (1992).
 - 130) W. Hu, T. Takeuchi, H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, **8**, 507 (1992).
 - 131) W. Hu, T. Takeuchi, H. Haraguchi: *Anal. Chim. Acta*, **267**, 141 (1992).
 - 132) W. Hu, H. Haraguchi: *Anal. Chem.*, **66**, 765 (1994).
 - 133) W. Hu, H. Haraguchi: *Anal. Chim. Acta*, **289**, 231 (1994).
 - 134) W. Hu, T. Takeuchi, H. Haraguchi: *Anal. Chem.*, **65**, 2204 (1993).
 - 135) W. Hu, H. Haraguchi: *Anal. Chim. Acta*, **285**, 335 (1994).
 - 136) W. Hu, H. Tao, H. Haraguchi: *Anal. Chem.*, **66**, 2514 (1994).
 - 137) C. F. Pereira: *J. Chromatogr.*, **624**, 457 (1992).
 - 138) 早川和一, 吉岡知恵子, 宮崎元一: 北陸公衆衛生学会誌, **12**, 14 (1985).
 - 139) 早川和一, 蛭名令子, 松本美枝子, 宮崎元一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **33**, 390 (1984).
 - 140) 山本 敦, 松永明信, 関口久義, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **31**, 47 (1985).
 - 141) 山本 敦, 松永明信, 牧野正雄: 衛生化学, **31**, 421 (1985).
 - 142) 石川雅章, 山本政利, 増井俊夫, 早川和一, 宮崎元

- 一, 中澤裕之, 藤田昌彦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **35**, 309 (1986).
- 143) D. R. Jenke: *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 352 (1986).
- 144) R. E. Poulson, H. M. Borg: *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 409 (1987).
- 145) D. Brown, R. Payton, D. Jenke: *Anal. Chem.*, **57**, 2264 (1985).
- 146) L. S. Wigman, M. L. Thomson, R. S. Wayne: *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 3219 (1989).
- 147) W. Buchberger, G. Rieger: *J. Chromatogr.*, **482**, 407 (1989).
- 148) 藤村一良, 渡辺訓行, 澤田嗣郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 237 (1994).
- 149) N. Chauret, J. Hubert: *J. Chromatogr.*, **469**, 329 (1989).
- 150) D. R. Jenke, N. Raghavan: *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 75 (1985).
- 151) B. P. Downey, D. R. Jenke: *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 519 (1987).
- 152) 弘中孝志, 大島光子, 本水昌二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 503 (1987).
- 153) M. T. Galceran, M. Diez, L. Paniagua: *J. Chromatogr. A*, **657**, 77 (1993).
- 154) B. B. Sithole, R. D. Guy: *Analyst* (London), **111**, 395 (1986).
- 155) D. W.-Bartferd, E. Grushka, S. A.-Bar, S. Levy, Y. Bambereger: *J. Chromatogr.*, **517**, 305 (1990).
- 156) Q. Xianren, W. Baeyens: *J. Chromatogr.*, **514**, 362 (1990).
- 157) 早川和一: “各種分析法におけるサンプリング—試料調製法と前処理技術”, (1993), (技術情報協会).
- 158) A. Yamamoto, A. Matsunaga, K. Hayakawa, E. Mizukami, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **7**, 719 (1991).
- 159) K. Hayakawa, A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, M. Nishimura, M. Miyazaki: *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 130 (1994).
- 160) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki, M. Nishimura, M. Kitaoka, T. Fujita: *Analyst* (London), in press.
- 161) 山本 敦, 松永明信, 水上英一: 日本食品衛生学雑誌, **33**, 301 (1992).
- 162) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki: *J. Chromatogr. A*, **667**, 85 (1994).



Advances of indirect photometric detection in liquid chromatography (Review).

Kazuichi HAYAKAWA* and Atsushi YAMAMOTO** (* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Takara-machi 13-1, Kanazawa-shi, Ishikawa 920; ** Toyama Institute of Health, Nakataikoyama 17-1, Kosugi-machi, Toyama 939-03)

New photometric detection methods developed for use in liquid chromatography have been reviewed. Differential photometric detection using UV-visible absorbing modifiers enabled us to examine the retention and detection mechanism of not only analytes but also mobile phases. Indirect photometric detection ion chromatography based on this theory separately and sensitively determines ionic compounds using a conventional high-performance liquid chromatographic system with a UV-visible absorbance detector. This method is useful for many kinds of samples such as environmental water, foods and biological materials. Polarized photometric detection methods with two polarizers on either side of a UV-visible absorbance detector flow cell have been developed. The monitor determines optically active compounds as the change in absorbance. This method was effectively applied for determining sugars and organic acids.

(Received January 30, 1995)

Keyword phrases

differential photometric detection; indirect photometric detection; high-performance liquid chromatography; UV-visible absorbance detector; ion chromatography; ionic compounds; differential chromatogram method; polarized photometric detection; polarizer; optically active compounds.