

報 文

イオン対試薬を使用しない逆相高速液体クロマトグラフィー
によるヨウ化物イオンの定量*宮下 正弘^{®1}, 瀬山 義幸¹Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Determination of
Iodide Ion without Using Ion-Pairing ReagentsMasahiro MIYASHITA¹ and Yoshiyuki SEYAMA¹¹ Department of Clinical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 22 March 2005, Accepted 26 May 2005)

Iodide ion (I^-) is a hydrophobic anion that can be retained on reversed-phase columns. We determined I^- by reversed-phase high-performance liquid chromatography without the use of ion-pairing reagents. I^- was separated on a Hydrosphere C18 column using 50 mM ammonium phosphate (pH 4.0)-acetonitrile (95 : 5, v/v) as a mobile phase and detected with a UV detector at 225 nm. The calibration curve was linear over the range of $2.5 \times 10^{-7} \sim 2.5 \times 10^{-4}$ M and the limit of detection was 0.5×10^{-7} M ($S/N = 3$). The relative standard deviations for six repeated determinations of 1.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} and 1.0×10^{-4} M of I^- were 1.7, 0.2 and 0.3%, respectively. This analytical method was applied to estimate the binding property of I^- for ovalbumin.

Keywords : iodide ion ; reversed-phase high-performance liquid chromatography ; ultrafiltration.

1 緒 言

逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) による無機陰イオンの分析では、親水性の無機イオンをカラムに保持させるため、アルキルアンモニウム塩をイオン対試薬として添加した移動相を使用する¹⁾²⁾。このイオン対 HPLC の手法は、ヨウ化物イオン (I^-) の分析にも広く応用され^{3)~7)}、国際標準化機構 (ISO) でも認証されている⁸⁾。

I^- は、チオシアン酸イオン (SCN^-) や過塩素酸イオン (ClO_4^-) などとともに、無機イオンの中では疎水性の強い陰イオンに属する⁹⁾。そのため、RP-HPLC では、イオン対試薬を使わなくても、 I^- 自身の疎水性によりカラムに保持させることができる。しかし、本質的には無機イオン

であるため、その保持はあまり強くなく、イオン対 HPLC 以外の手法で分析されることはなかった。このような状況の中、近年、ポリエチレングリコールを固定相としたマイクロ LC で、イオン対試薬を使わずに I^- を分離・定量する方法が開発された¹⁰⁾ことは注目に値する。

RP-HPLC で化合物の保持を高めるためには、移動相の有機溶媒の含量を減らし、相対的に水の含量を増やせばよい。しかし、水の含量が 100% に近い移動相では、時間の経過とともに保持が減少し、分離の再現性が悪くなることが知られている¹¹⁾。この問題に対し、近年、水 100% の移動相でも再現性の良い分離が得られる逆相カラムが開発され、保持の弱い親水性化合物の分析に適用されるようになってきた。そこで、このようなカラムを使用して、適切な条件を選べば、イオン対試薬を使わなくても、 I^- を分析することが可能になるのではないかと考えた。

本研究では、イオン対試薬を使わずに、 I^- を RP-HPLC で分析する方法を開発するため、分離条件及び定量性を検

* ヨウ素化合物の研究 (第 12 報)。前報は宮下正弘ほか、分析化学, 53, 1167 (2004)

¹ 星薬科大学臨床化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Retention of iodide ion on reversed-phase columns^{a)}

Column	Retention time/min	k^b
Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm I.D.)	2.28	0.42
Develosil C30-UG-5 (150 × 4.6 mm I.D.)	1.98	0.29
Mightysil RP-18 Aqua (150 × 4.6 mm I.D.)	1.88	0.25

a) Analytical conditions: mobile phase, 0.05 M ammonium phosphate (pH 4.0)-CH₃CN (95 : 5, v/v); flow rate, 1.0 ml min⁻¹; column temperature, room temperature; detection, UV at 225 nm; sample, 5.0 × 10⁻⁶ M KI; injection volume, 10 μl; b) Capacity factor

討した。そして、この分析法を、I⁻とタンパク質の結合性を調べる実験に応用したので報告する。

2 実 験

2・1 試薬及び標準液

ヨウ化カリウム (KI) は和光純薬から、液体クロマトグラフ用のアセトニトリルは関東化学から入手した。また、オバルブミン (Grade V) は Sigma から入手した。その他の試薬は市販の精密分析用あるいは特級規格の製品を使用した。

I⁻の標準液は、あらかじめ KI を水に溶解して 1 × 10⁻² M の標準原液を調製しておき、これを用時 HPLC の移動相溶媒で所定の濃度に希釈して調製した。

2・2 装置及び器材

高速液体クロマトグラフは 600E マルチソルベント送液システム (Waters 製)、484 チューナブル紫外可視吸光 (UV/VIS) 検出器 (Waters 製)、sic オートサンプラー 23 (システムインスツルメンツ製) 及び sic クロマトコーダー 12 (システムインスツルメンツ製) より構成した。分離カラムは Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm I.D., ワイエムシイ製)、Develosil C30-UG-5 (150 × 4.6 mm I.D., 野村化学製) 及び Mightysil RP-18 Aqua (150 × 4.6 mm I.D., 関東化学製) を使用した。限外濾過用の遠心式フィルターユニットはウルトラフリー-MC LGC (再生セルロース製メンブレン, 分画分子量 10000, Millipore 製) を使用し、遠心は卓上型遠心分離器 KR-1000 (フナコシ製) で行った。

2・3 HPLC によるヨウ化物イオンの分析

I⁻の保持挙動及び定量性を調べる実験は、いずれも移動相に 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液-アセトニトリルを使用して行った。また、カラム温度は室温に保ち、移動相の流量は 1.0 ml min⁻¹ に、検出波長は 225 nm に、試料

の注入量は 10 μl に設定した。定量はピーク面積による絶対検量線法で行った。

2・4 限外濾過によるヨウ化物イオンの処理

1.0 × 10⁻³ M KI 50 μl に 1% オバルブミン 400 μl 及び水 (又は 1 M H₃PO₄, 1 M NaOH) 50 μl を加えて混合した後、その 200 μl をウルトラフリーに載せ、9000 rpm (4350 g) で 15 分間遠心し、限外濾過を行った。この操作で得られた濾液は、その 50 μl に HPLC の移動相溶媒 450 μl を加えて 10 倍希釈し、分析用の試料とした。なお、比較のため、1% オバルブミンの代わりに水 400 μl を使用して調製したのも同様に処理 (ただし、タンパク質を含まない試料は濾過速度が速いので、遠心時間は 7.5 分に変更) し、分析用の試料とした。

3 結果及び考察

3・1 分離カラムの検討

水 100% の移動相でも使用可能な市販の 3 種類のカラムについて、同じ移動相 {0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0)-アセトニトリル (95 : 5, v/v)} を使用した場合の I⁻の保持時間及び保持係数 (k) を調べた (Table 1)。なお、 k は $k = (V_R - V_0)/V_0$ の式で計算した。ここで、 V_R は I⁻の保持容量、 V_0 はカラムの空隙容量を表す。 V_0 は、アセトニトリル-水 (50 : 50, v/v) を移動相としてウラシルを分析し、その保持容量から求めた。各カラムの V_0 は、Hydrosphere C18 で 1.61, Develosil C30-UG-5 で 1.53, Mightysil RP-18 Aqua で 1.51 ml であった。

その結果、Hydrosphere C18 で最も強い保持が得られることが分かった。そこで、本分析では、これを分離カラムとして使用することにした。

3・2 移動相の検討

3・2・1 移動相の pH 移動相のリン酸アンモニウム緩衝液の pH を 3 から 7 まで変化させ、I⁻の保持に対する影響を調べた (Fig. 1)。

その結果、pH 4 で保持が最大となることが分かった。なお、ここでの保持の変動はあまり顕著ではなかったが、後述 (3・4・1) で述べるように、本分析の保持時間の再現性は極めて良好であったので、その差は有意であると判断した。そこで、本分析では、pH 4 の緩衝液を移動相に使用することにした。

3・2・2 移動相のリン酸緩衝液の濃度 移動相のリン酸アンモニウム緩衝液の濃度を 0.02 から 0.1 M まで変化させ、I⁻の保持に対する影響を調べた (Fig. 2)。

その結果、あまり顕著ではなかったが、濃度が低くなるほど保持が強くなる傾向が分かった。そのため、保持の面では、0.02 M の緩衝液を使用するのが適切であると考え

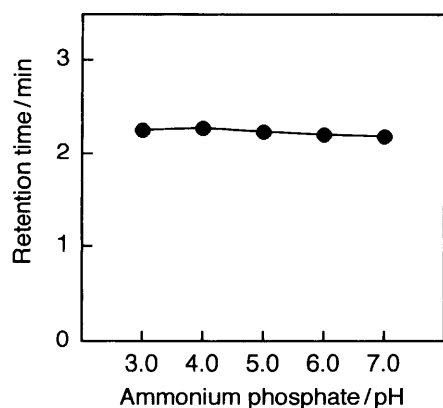


Fig. 1 Effect of ammonium phosphate pH on the retention of iodide ion

Mobile phase: 0.05 M ammonium phosphate-CH₃CN (95 : 5, v/v); column: Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm I.D.). The other chromatographic conditions are the same as in Table 1.

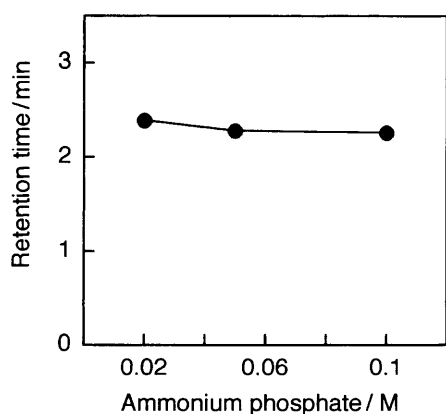


Fig. 2 Effect of ammonium phosphate concentration on the retention of iodide ion

Mobile phase: ammonium phosphate (pH 4.0)-CH₃CN (95 : 5, v/v); column: Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm I.D.). The other chromatographic conditions are the same as in Table 1.

た。しかし、溶液の濃度が低いと、試料に他の無機イオンが共存した場合、分析の妨害を受けやすくなるのではないかと懸念があった。そこで、本分析では、緩衝能の面から、0.05 M の緩衝液を移動相に使用することにした。

3・2・3 移動相のアセトニトリルの濃度 移動相の CH₃CN の濃度を 0 から 30% まで変化させ、I⁻ の保持に対する影響を調べた (Fig. 3)。

その結果、あまり顕著ではなかったが、5% 付近で保持が最大となることが分かった。そこで、本分析では、移動相の CH₃CN の濃度を 5% とすることにした。

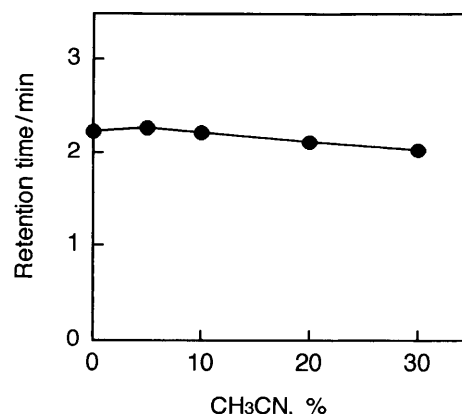


Fig. 3 Effect of acetonitrile concentration on the retention of iodide ion

Mobile phase: 0.05 M ammonium phosphate (pH 4.0)-CH₃CN; column: Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm I.D.). The other chromatographic conditions are the same as in Table 1.

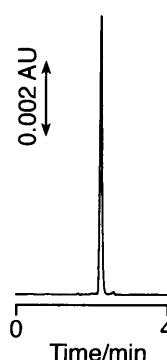


Fig. 4 HPLC chromatogram of iodide ion

Column: Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm I.D.). The other chromatographic conditions are the same as in Table 1.

3・3 分離の最適条件

上述の実験結果から、本分析では、最終的に Hydrosphere C18 カラムと、0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0)-アセトニトリル (95 : 5, v/v) から成る移動相の組み合わせを分離の最適条件として、I⁻ の分析を行うことにした。本条件で測定した標準試料のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。

また、比較のため、本条件下における I⁻ と紫外吸収を持つ他の陰イオンとの分離を Fig. 5 に示した。I⁻ は他の無機及び有機陰イオンと良好に分離することが分かった。なお、ここでは、I⁻ 以外の陰イオンの検出感度を高めるため、検出波長を 210 nm に変更したが、225 nm に吸収極大を持つ I⁻ の感度はこの波長では低下した。

本分析では、イオン対試薬に使われる有機のアルキルア

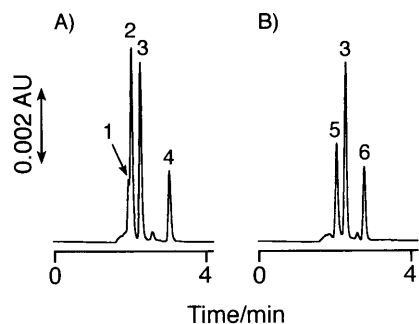


Fig. 5 HPLC chromatograms of iodide ion and other anions

Sample (concentration): A) mixture of KI (5.0×10^{-6} M), KBr (5.0×10^{-6} M), KNO₃ (5.0×10^{-6} M) and KSCN (5.0×10^{-6} M), B) mixture of KI (5.0×10^{-6} M), formic acid (5.0×10^{-4} M) and acetic acid (5.0×10^{-4} M); column: Hydrosphere C18 (150 $\times$ 4.6 mm I.D.); detection: UV at 210 nm. The other chromatographic conditions are the same as in Table 1. Peaks: 1, Br⁻; 2, NO₃⁻; 3, I⁻; 4, SCN⁻; 5, HCOO⁻; 6, CH₃COO⁻

ンモニウム塩との関連から、無機のアモニウム塩（リン酸アモニウム）を緩衝液に使用したが、他のカリウム塩（リン酸カリウム）やナトリウム塩（リン酸ナトリウム）を緩衝液に使用しても、同じような分離が得られた。

3.4 定量性の検討

3.4.1 検量線・検出限界・再現性 2.5×10^{-7} から 2.5×10^{-6} M, 2.5×10^{-6} から 2.5×10^{-5} M 及び 2.5×10^{-5} から 2.5×10^{-4} M の各濃度範囲において I⁻ の検量線を作成した (Table 2)。

どの範囲でも試料濃度とピーク面積の間には良好な直線関係（相関係数は 0.999 以上）が認められ、各回帰直線はほぼ同じ傾きを示した。よって、本分析法の定量範囲は 2.5×10^{-7} から 2.5×10^{-4} M であると断定した。検出限界 ($S/N=3$) は 0.5×10^{-7} M であった。また、 1.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} 及び 1.0×10^{-4} M の各 I⁻ を繰り返し分析 ($n=6$) した場合、保持時間の相対標準偏差は、それぞれ 0.02, 0.04 及び 0.04% で、また、定量値の相対標準偏差は、それぞれ 1.7, 0.2 及び 0.3% で、再現性も良好であった。なお、本分析法の感度は、イオン対試薬を使った従来の分析法⁷⁾の感度とほぼ同じであった。

3.4.2 共存物の影響 分析試料に他の成分が共存した場合の I⁻ の定量に対する影響を調べた。共存物としては、I⁻ の固相抽出で使われる酢酸及びアンモニア⁷⁾を、また、実試料の pH 調整で使うことが想定されるリン酸及び水酸化ナトリウムを選んだ。更に、UV 吸収を持った酸である臭化水素酸、硝酸及びギ酸の共存の影響も調べた。この実験では、 1.0×10^{-4} M の KI 50 μ l に、これらの化合物

Table 2 Calibration curves for iodide ion

Range/M	Regression line ^{a)}	r ^{b)}
$2.5 \times 10^{-7} \sim 2.5 \times 10^{-6}$	$y = 6.89 \times 10^9 x - 33$	0.999
$2.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-5}$	$y = 6.81 \times 10^9 x - 663$	0.999
$2.5 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-4}$	$y = 6.52 \times 10^9 x + 11647$	0.999

a) y : peak area (μ Vs); x : concentration (M) of I⁻; b) Correlation coefficient

Table 3 Effect of foreign substances on the determination of iodide ion ^{a)}

Substance	Added/M	Relative peak area ^{b)} , %
None		100.0
HBr	0.05	96.2
	0.20	79.9
	0.50	66.0
H ₃ PO ₄	0.05	101.2
	0.20	101.0
	0.50	101.4
CH ₃ COOH	0.05	99.7
	0.20	100.1
	0.50	101.0
NH ₄ OH	0.05	99.1
	0.20	98.1
	0.50	96.9
NaOH	0.05	98.5
	0.20	— ^{c)}
	0.50	— ^{c)}

a) Concentration of I⁻ in sample was 1×10^{-5} M; b) Means of five experiments; c) Determination of I⁻ was impossible due to peak splitting.

の水溶液 (0.5, 2 又は 5 M) 50 μ l を個別に加えた後、更に移動相 400 μ l を加えて試料を調製した。そして、これらの試料（すなわち、 1.0×10^{-5} M の I⁻ に対し、0.05, 0.2 又は 0.5 M の共存物を含んだ試料）を HPLC で分析し、I⁻ の定量値を比較した。なお、各定量値は、共存物を全く添加していない試料の定量値を 100% としてその相対値で表した (Table 3)。

臭化水素酸が共存した場合、I⁻ は Br⁻ の大きなピークのすその上に載って溶出し、定量値は無添加の試料よりも低下した。この低下は共存濃度が高いほど顕著であった。リン酸が共存した場合、I⁻ の前に小さなピークが現れたが、分離上の問題はなく、どの共存濃度でも定量への影響はなかった。酢酸が共存した場合、I⁻ の後ろに酢酸イオンの大きなピークが現れたが、分離上の問題はなく、どの共存濃度でも定量への影響はなかった。アンモニアが共存した場合、I⁻ の前に小さなピークが現れ、そのすそが I⁻ のピークにかかったが、0.2 M 以下の共存では定量への影響はなかった。しかし、0.5 M の共存では定量値が少し低下した。水酸化ナトリウムが共存した場合、アンモニアと同じように I⁻ の前に小さなピークが現れ、そのすそが I⁻ のピークにかかったが、0.05 M の共存では定量への影響はなかつ

Table 4 Concentration of iodide ion in filtrate obtained by ultrafiltration

Sample ^{a)}	Relative concentration ^{b)} , %	(RSD, %)
KI in H ₂ O	81.3	(4.1)
KI in H ₂ O containing ovalbumin	117.2	(0.6)
KI in 0.1 M H ₃ PO ₄	101.4	(0.8)
KI in 0.1 M H ₃ PO ₄ containing ovalbumin	75.5	(5.5)
KI in 0.1 M NaOH	99.9	(0.7)
KI in 0.1 M NaOH containing ovalbumin	102.0	(2.1)

a) Concentration: KI, 1.0×10^{-4} M; ovalbumin, 0.8%; b) 1.0×10^{-4} M was taken as 100. Means of four experiments

た。しかし、0.2 M 以上の共存では I⁻ のピークが分裂を起こすため、定量は不可能であった。また、Table 3 には示していないが、硝酸及びギ酸が共存した場合、これらの大きなピークが I⁻ のピークと重なるため、0.05 M の共存でも定量は不可能であった。

このようなことから、I⁻ の定量に対する共存物の影響は、I⁻ の近くに UV 吸収の強い化合物が溶出する場合、また、酸よりも塩基が共存した場合強く現れることが分かった。なお、塩基の定量への影響は、イオン対試薬を使った従来の分析法⁷⁾でも認められたが、そこでは、共存濃度が 0.04 M でも定量に影響があった。そのため、塩基が 0.05 M 以下なら定量に全く影響しない本分析法のほうが共存物の妨害は受けにくいとすることができる。

3.5 分析の応用例

生体や食品中の I⁻ は種々のタンパク質と共存している。そのため、I⁻ とタンパク質の結合性を調べることが重要になる。この結合性を調べる一つの手段として限外濾過法がある。すなわち、I⁻ とタンパク質の共存した試料を限外濾過すると、遊離の I⁻ は濾過膜を透過するが、高分子のタンパク質に結合した I⁻ は濾過膜を透過しないで残る。そのため、濾液の I⁻ の濃度を調べることによって、I⁻ とタンパク質の結合の割合を知ることができる。そこで、この限外濾過の実験に、本研究で開発した I⁻ の分析法を適用することにした。著者らは、健康食品として市販されているヨード強化卵のヨウ素の化学形態に関心があったので、I⁻ とオバルブミン（卵白アルブミン）の様々な混合物を 2.4 に記した方法で限外濾過し、濾液の I⁻ の濃度を定量した。なお、各 I⁻ の濃度は、限外濾過する前の濃度 (1.0×10^{-4} M) を 100% として、その相対値で表した (Table 4)。

水を溶媒とした試料では、I⁻ を単独で濾過した場合、その濃度は 81.3% に低下した。つまり、この条件では、I⁻ がそれ自身濾過膜を自由に透過しないことが分かった。ま

た、オバルブミンと共存した I⁻ を濾過した場合、その濃度は 117.2% と、元の濃度よりも高くなる予期せぬ結果が得られた。この結果については、濾液の I⁻ を従来の分析法⁷⁾で分析しても同じ結果が得られたこと、また、濾液に標準の I⁻ を添加して行った回収試験でも回収率に異常がなかった（平均で 101.0%）ことから、分析法に問題はないと断定した。更に、オバルブミンを単独で濾過したものを分析しても、I⁻ の位置には何も溶出してこなかったもので、これにも正の誤差となる問題はなかった。よって、I⁻ の濃度が高くなったのは、限外濾過そのものに問題があったと推定した。このように、単純な水溶液の状態にある I⁻ の限外濾過には不可解な点があったので、結合性を調べる実験にこれを適用することは難しいと判断した。

H₃PO₄ を添加した試料では、I⁻ を単独で濾過した場合、その濃度は 101.4% と、ほとんど変化しなかった。つまり、この酸性条件下では、I⁻ は濾過膜を自由に透過することが分かった。また、オバルブミンと共存した I⁻ を濾過した場合、その濃度は 75.5% に低下した。これは、I⁻ とオバルブミンが結合した（結合率は 24.5%）結果であると考えた。この結合は、正に荷電したオバルブミンと I⁻ のイオニックな相互作用によって生じた可能性が高い。

NaOH を添加した試料では、I⁻ を単独で濾過した場合、その濃度は 99.9% とほとんど変化しなかった。つまり、この塩基性条件下では、I⁻ は濾過膜を自由に透過することが分かった。また、オバルブミンと共存した I⁻ を濾過した場合も、その濃度は 102.0% とほとんど変化しなかった。よって、この条件下では、I⁻ はオバルブミンと結合していないと考えた。

4 結 語

本研究では、イオン対試薬を使わずに、I⁻ を RP-HPLC で分析する方法を確立した。この分析では、簡単な移動相を使って従来の分析法と同じ感度で I⁻ を定量することが可能であった。一方、従来の分析法に比べると、保持があまり大きくなく、分離を調節しにくいのが難点であった。しかし、高度な分離を必要としなければ十分実用的な分析法であった。

(2001 年 11 月, 日本分析化学)
会第 50 年会において一部発表

文 献

- 1) 野村哲夫: “イオンクロマトグラフィー”, 武藤義一, 及川紀久雄編, p. 91 (1983), (講談社サイエンティフィック).
- 2) P. K. Dasgupta: “Ion Chromatography”, Edited by J. G. Tarter, p. 191 (1987), (Marcel Dekker, New York).
- 3) W. J. Hurst, K. P. Snyder, R. A. Martin, Jr.: *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 2067 (1983).
- 4) M. Miyashita, K. Kaji, Y. Seyama, S. Yamashita:

- Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2430 (1984).
- 5) H. Nagashima, K. Nakamura: *J. Chromatogr.*, **324**, 498 (1985).
- 6) 宮下正弘, 山下三郎: 衛生化学, **40**, 427 (1994).
- 7) 宮下正弘, 山下三郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 143 (1997).
- 8) ISO/FDIS 14378: Milk and dried milk—Determination of iodide content—Method using high-performance liquid chromatography (2000).
- 9) 武藤義一, 及川紀久雄, 松下 駿, 鈴木義仁, 鈴木啓子, 浜野吉政, 本間春雄, 村野健太郎, 高田芳矩: “イオンクロマトグラフィーデータブック”, 日本分析化学会イオンクロマトグラフィー研究懇談会編, p. 52 (1991), (科学新聞社).
- 10) L. Rong, T. Takeuchi: *J. Chromatogr. A*, **1042**, 131 (2004).
- 11) 長江徳和, 榎並敏行: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 887 (2000).

要 旨

ヨウ化物イオン (I^-) が疎水性を持つことに着目し, これをイオン対試薬を使わずに逆相高速液体クロマトグラフィーで分析する方法について検討した. 本分析では, カラムに Hydrosphere C18 を, 移動相に 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) - アセトニトリル (95:5, v/v) を使用して分離を行い, 紫外吸光法 (225 nm) で検出を行った. 試料注入量を 10 μ l とした場合の I^- の定量範囲は 2.5×10^{-7} から 2.5×10^{-4} M で, 検出限界は 0.5×10^{-7} M ($S/N=3$) であった. また, 1.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} 及び 1.0×10^{-4} M の各 I^- を繰り返し分析 ($n=6$) した場合の定量値の相対標準偏差は, それぞれ 1.7, 0.2 及び 0.3% で, 再現性も良好であった. 本研究で確立した分析法を, I^- とタンパク質の結合性を調べる実験に応用した.