

化学発光検出超臨界流体フローインジェクション法によるラクトンの微量定量

石井 幹太[®], 小池 充*

(1992 年 10 月 8 日受理)

超臨界流体 (SCF) の高密度流体特性を利用した微量ラクトンの化学発光 (CL) 分析法を FIA を用いて確立した。本分析システムは 1 流路から成る。CL は 2 基の注入器 (試薬用 S_1 : 100 μ l, 試料用 S_2 : 20 μ l) を用いて CO_2 -SCF 中に試薬 ($\text{NaOH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 試料 (ラクトン/ CH_3COCH_3) の順で導入して発生させる。CL 発生機構は次のとおりである。ラクトンと NaOH 及び $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{NaOH}$ との反応でそれぞれオキシカルボン酸とグリコール酸エステルが生成する。それらの反応でジエステルが生成し、溶存酸素と反応して過シュウ酸エステル様の高エネルギー中間体が生じる。この励起化合物から CL が得られる。又 CL は CO_2 -SCF で増感される。本分析システムの分析化学的特性 (代表として γ -ブチロラクトン: γ -BuLac) は以下のとおりである。検出下限: 1.0×10^{-10} M (20 μ l 注入法: $S/N=2$)。検量線の直線範囲: $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ M。選択性: ラクトンに高選択的で β -BuLac など他のラクトン類には同程度の感度を有して CL が得られる。再現性: RSD で 5.5% (20 μ l 注入法で 1×10^{-8} M の γ -BuLac 試料の 5 回繰り返し測定)。分析所要時間: 約 3 秒。コーヒーエッセンス中での γ -BuLac の回収試験も良好であった。

1 はじめに

食品など芳香剤を取り扱う化学工業では素材や調合割合の多様化に伴って高度な香気成分分析が必要となっている¹⁾²⁾。とりわけ香気成分は微量用いられる場合が多く、製品を高度に管理するには高感度な分析法の開発が急務となっている。例えば、ラクトンは食品工業での芳香剤¹⁾として用いられるが、品質管理には間接定量法³⁾や GC 法⁵⁾が用いられ、最近では GC 法がはん用されている。しかし、装置の大型化や測定感度及び分析操作の煩雑さなど、品質管理の高度化と相まって改良が必要である。

著者らは化学発光 (CL) の分析化学への応用を進めてきた^{6)~8)}。CL 分析法は感度が高いことを特長とするが、フローインジェクション分析法 (FIA) と組み合わせることで測定の迅速性、簡便性及び再現性に優れた分析法となり得ることは周知のことである。CL 分析法の感度の向上を図るには配向性分子集合体⁹⁾などいくつかの手法⁶⁾⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾が考案されているが、著者らはその一つとして超臨界流体を利用した FIA/CL 法の研究を進めている¹²⁾¹³⁾。超臨界流体は高密度流体として知られ、

拡散係数や粘性などに格別な特性が反映される¹⁴⁾¹⁵⁾。

CL 分析に超臨界流体を利用するとその溶媒特性によって CL 収率が向上することを著者らは先に報告した¹²⁾¹³⁾。又、CL は励起化学種に関係する現象であるから、超臨界流体中での CL は、1) 特殊溶媒での励起化学種の生成、反応及び安定性などの評価に利用できる、2) 励起化学種の CL 挙動から逆に超臨界流体の溶媒特性を知ることができるなど、CL の分析化学への応用にとどまらず励起化学種の関与する化学分野にも貢献できる利点がある。

ところで、ラクトンはアルカリによって容易に開環してオキシカルボン酸塩を生じ¹⁶⁾、又アルカリ性下アルコール類と反応してグリコール酸エステルを生成する¹⁶⁾。これらは共存するとシュウ酸ジエステル様のジエステルを生成するので、これらに過酸化水素のような酸化剤の存在あるいは他の励起エネルギーの供与があると過シュウ酸エステルの CL⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾のように高エネルギー中間体が生成し CL の発生が期待できる。

ラクトン/アルカリ/アルコール系を中心に CL を探索したところ、ラクトン/アセトン/アルカリ/エタノールの新しい CL 反応系を見いだした。この CL 反応を超臨界流体 FIA (SCF-FIA) に組み込んだラクトンの微量分析法を開発したので報告する。

* 明治大学理工学部工業化学科: 214 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

2 実 験

2・1 SCF-FIA/CL 分析システム

構築した SCF-FIA/CL 分析システムを Fig. 1 に示す。本分析システムは 1 流路から成り、CO₂ 超臨界流体用ポンプ (B), ポンプ (P), 2 個の試料注入器 (S₁, S₂), 検出器 (D) 及び記録計 (R) により構成されている。CL 検出部 (D) は, LUMI-FLOW (日音医理科機器製作所製 LF-800) 及び光電子増倍管 (PMT: 浜松ホトニクス製 1P-21S) で構成され, 送液ポンプ (P) は高速液体クロマトグラフ (HSLC) 用ポンプ (島津製作所製 LC-6A) を超臨界流体用に改良した。記録計はペン式アナログ記録計 (東亜電波工業製 EPR-151A) を用いた。反応セルは内径 0.2 mm, 長さ 15 cm のエポキシアクリルで表面処理した透明なガラス製細管を使用し, 光電子増倍管受光面 (直径 3 cm) に直線状に設置した。圧力調節のために反応セルの出口にステンレス製細管 (長さ 130 cm, 内径 0.15 mm) を接続した。ステンレス製細管は強度的に優れ, 外部からの迷光を防ぐのに適しているため用いた。ステンレス製細管の先端は流出する超臨界流体が凍結するのを防ぐため約 45°C の温水中に浸した。試薬及び試料溶液の導入は HSLC 用試料注入器 (Rheodyne 製 7125 型: S₁, 試薬導入用で 100 µl; S₂, 試料導入用で 20 µl) を使用した。大きさを違えて用いたのは以下の理由による。このような試薬及び試料溶液の導入方法は大きな試薬ゾーンの中に小さい試料ゾーンを導入することになる。つまり試薬ゾーンが大きく取

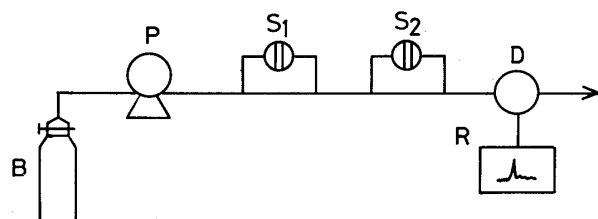


Fig. 1 SCF-FIA/CL flow system

B: cylinder for CO₂ SCF; P: high pressure pump, S₁: 100 µl injector for reagents, S₂: 20 µl injector for sample, D: detector; R: recorder. Explanation for each part is described in the text. Abbreviations: SCF (supercritical fluid), FIA (flow injection analysis), CL (chemiluminescence). Optimal experimental conditions: 1.0×10^{-2} M sodium hydroxide/ethanol for S₁ and sample/acetone for S₂ at flow rate of 6.0 ml/min; chart speed, 10 cm/min; range for the LUMI-FLOW detector, 0.1 (high sensitivity range)

れ, その試薬ゾーンの中に微小サイズの試料を導入するので, 手動による試料の導入あるいは早い流れ系での試薬導入においても試薬ゾーンの中に効果的に試料を導入できる。加えて CL 反応も効率よく行うことができる。なお, 試薬導入器 S₁ と送液ポンプとの距離は 10 cm で, S₁ と試料導入器 S₂ の距離は 30 cm, 試料導入器 S₂ は CL 応答を十分検出できるようにできるだけ反応セル近く (約 10 cm) に設置し, 反応セルから出口までは 30 cm とした。

2・2 装 置

可視・紫外スペクトル解析には島津製作所自記分光光度計 UV-2000 を用いた。

水分測定には京都電子製カールフィッシャー分析計 MKA-3p を用いた。

2・3 試薬と試料

試薬類は関東化学, 東京化成工業及び和光純薬工業の市販特級品をそのまま使用した。試料調製用の水は東京理化機器製 RO-10C 型純水製造装置を用いて得られる蒸留後脱イオンした水 (以下純水と略記) を使用した。

ラクトン試料: 市販品のラクトン原液 (純度 99.5% 以上) を用い, 必要に応じてアセトンなど有機溶剤に溶かして使用した。

微量水分定量用カールフィッシャー試薬は Harris の方法¹⁹⁾ に準じて調製した。

回収試験用試料: 市販コーヒー豆 5 g を乳鉢ですりつぶし, 粉末 1.0 g をアセトン 500 ml の入ったビーカーに添加した。30 分間ガラス棒でかき混ぜた後, 遠心分離機 (国産遠心機製 H-11n) で 3000 rpm, 20 分間遠心分離した。次いで上澄み液を 10 ml 分取し, それに γ -ブチロラクトン (γ -BuLac) を既知量添加して試料溶液とした。

可視・紫外スペクトル解析及び水分確認のための試料: 水酸化ナトリウム (4.0 g) を 5 ml のエタノール (純度 99.5%) に溶解した溶液 (I) と 1 ml の γ -BuLac 原液を 4 ml のアセトンに溶かした溶液 (II) を I, II の順で混合調製し, 10 分間放置して CL 反応を完結した後使用した。から試験液には γ -BuLac の代わりにアセトンを 1 ml 加えて調製した。

2・4 実験方法

超臨界流体用のバッチ式 CL 解析装置は現存しないので, ラクトンの関与する CL の性質についての実験は水系と超臨界流体の場合に分け, 前者はバッチ式 CL

反応検索システム²⁰⁾で、後者は Fig. 1 に示したフローシステムを用いて行った。

2・4・1 水系での基礎実験 バッチ法では試薬溶液などは導入間隔などを配慮しながら各々 3 ml ずつ反応セル内に導入した。CL プロファイルの強度及び反応時間などの観察から試薬の組み合わせ及び混合順序などを決定した。

各種ラクトンの CL の検討では入手できた 3 種類のラクトン、 β -ブチロラクトン (β -BuLac)、 γ -ブチロラクトン (γ -BuLac) 及び γ -ノナラクトン (γ -NonaLac) について検討した。試薬は 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液とエタノール (99.5%) 及びラクトン原液を用いた。

アルコールはラクトンの開環及びエステル化反応に必要となるので、アルコール類はメタノール、エタノール、1-プロパノール及び 1-ブタノールを選び、各アルコール (99.5% 以上) と 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液及び γ -BuLac の原液を用いて検討した。

本 CL ではジエステル系 CL が予測されるので、この場合はシュウ酸誘導体の CL に見られるように往々にしてフルオロフォア⁶⁾²¹⁾の寄与⁶⁾²¹⁾ (例えば色素増感など) が期待できる。増感剤色素はエオシン Y、ローダミン B、ウラニンなどの 6 種類のキサンテン系色素 (1×10^{-4} M) を用い、そのエタノール溶液と水酸化ナトリウム/エタノール溶液 (0.5 M) 及び γ -BuLac 原液を用いて検討した。

2・4・2 超臨界流体での基礎実験 超臨界流体の場合は試薬類は試料注入器 S_1 (100 μ l) に導入し、試料のラクトンは試料注入器 S_2 (20 μ l) に導入して実験した。

ラクトンの CL の検討では入手できた β -BuLac(A)、 γ -BuLac(B) 及び γ -NonaLac(C) を用いた。試料注入器 S_1 (100 μ l) から水酸化ナトリウム/エタノール溶液 (1×10^{-2} M)、 S_2 (20 μ l) からラクトン原液を導入した。

ラクトンの含まれる試料は食品バターのように有機物が多い。従って実試料分析を行う場合には試料を溶解できる溶媒の選択が必要である。試料溶媒の検討は以下の方法を用いた。超臨界流体 FIA では多量の水の存在は超臨界状態の劣化と流路の凍結の危険性が高い。この解決には温度を上げるか、あるいは水に代えて有機溶媒を利用する必要がある。特に本 CL 反応ではエステルと水の生成が予測されるので、有機溶媒を用いる場合には FIA の流路内で水と有機溶媒の分離が起こらないように水に親和性の高い有機溶媒を利用することが好まし

い。本研究の場合は使用する試薬類などが全て有機溶媒に可溶であることから実験操作の容易な有機溶媒を利用した。実験にはラクトンを溶かし得る溶媒で、極性が異なり、又はん用的で、水との親和性の異なる溶媒、すなわちエタノールとアセトン (水との親和性が高い) 及び四塩化炭素 (水との親和性は低い) を選んだ。試料注入器 S_1 (100 μ l) から水酸化ナトリウム/エタノール溶液 (1×10^{-2} M) を、 S_2 (20 μ l) から前記の 3 種類の有機溶媒に溶かしたラクトン溶液 (0.1 M, 1×10^{-6} M) を導入した。

増感剤色素はウラニンをを用い、 1×10^{-5} M ~ 1×10^{-2} M の範囲で検討した。

従来の FIA/CL 分析システム(A) と SCF-FIA/CL (B) での CL プロファイルの比較は以下の方法で検討した。A の場合は超臨界流体の代わりにアセトンをキャリアーとして用い、流量は 6.0 ml/min とした。A の場合流路 L_1 からアセトンを流し、試料注入器 S_1 (100 μ l) から水酸化ナトリウム/エタノール溶液 (1×10^{-2} M)、 S_2 からラクトン/アセトン溶液 (1×10^{-2} M) を導入した。B の場合は流路 L_1 から超臨界流体を流し、A の場合と同様に試薬及び試料 (1×10^{-6} M) を導入した。

本 SCF-FIA/CL 分析システムで CL 反応の選択性の検討は以下の方法を用いた。 γ -BuLac のアセトン溶液の代わりに種々の化合物のアセトン溶液を注入して CL 強度を調べた。試料注入器 S_1 (100 μ l) から水酸化ナトリウム/エタノール溶液 (1×10^{-2} M)、 S_2 から γ -BuLac/アセトン溶液の代わりに β -BuLac と γ -NonaLac (1×10^{-6} M) 及び金属化合物など種々の化合物溶液 (1×10^{-2} M) を導入した。試料の溶媒にはアセトンを用いたが、金属などアセトンに不溶な化合物はアセトン 9 容と純水 1 容の混合溶媒を用いた。

SCF-FIA/CL 分析システムの設計と操作条件の最適化は、試薬の組み合わせ方や種類及び濃度あるいは流量について検討した。その場合、最も大きな CL 強度 (本実験では CL プロファイルの高さで表示した) が得られる条件を検索した。なお、最適実験条件下でのラクトン類の検量線の作成では CL プロファイルの面積値を CL 強度として表示し、アセトンによるバックグラウンド CL (BG-CL) 強度は除いて濃度と CL 強度の関係を求めた。応答ピークはわずかなテイリングを示すが、半値幅法を用いて面積測定を行っても大きな誤差を生じなかったので、面積測定は半値幅法を用いた。

水酸化ナトリウム/エタノール溶液の水酸化ナトリウム濃度による CL 強度への影響を調べる場合には、試

料注入器 S_1 に水酸化ナトリウム/エタノール溶液を $1 \times 10^{-3} \sim 1 \text{ M}$ の範囲で、 S_2 に γ -BuLac/アセトン溶液 ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) をそれぞれ導入した。又、流量はポンプの流量を変えて $1.0 \sim 9.0 \text{ ml/min}$ の範囲で検討した。

他成分の影響については γ -BuLac ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) と他の化合物 (γ -BuLac 以外のラク톤は $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ でその他の化合物は $1 \times 10^{-2} \text{ M}$) の共存試料を用い、 γ -BuLac だけの場合の CL 強度とそれに各種化合物を共存させた場合の CL 強度との比較から試料ラク톤以外の成分の干渉の程度を調べた。

3 結果と考察

3.1 水系 CL の基礎実験

3.1.1 各種ラク톤の CL Fig. 2 に得られた CL プロフィールを示す。CL プロフィールの大きさは高さでは β -BuLac(A)、面積では γ -BuLac(B) が最大であった。この CL 収量の違いは生成するエステルのエステル結合の位置の違いも一因と考えられる。以後の実験ではラク톤には代表として CL 収量の最も大きい γ -BuLac を用いることとした。

3.1.2 アルコールの選択 結果を Fig. 3 に示す。結果は Fig. 2 の場合と同様な傾向を示し、CL プロフィールの大きさは高さではメタノール、面積ではエタノールが最大であった。なお 4 種類のアルコールを混合順序及び混合間隔を変えて検討したが、特に著しい違いは認められなかった。又水酸化ナトリウムを純水に溶かすのではなく、エタノールに溶かした場合のほうが

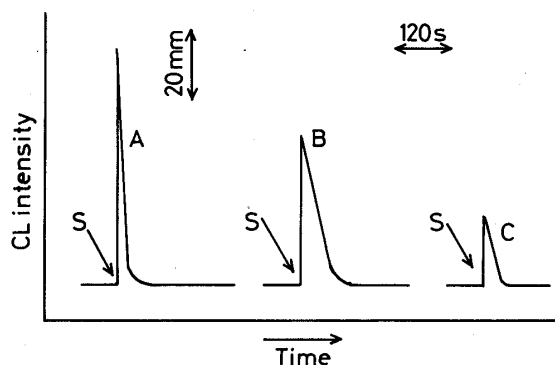


Fig. 2 CL profile for three kinds of lactone by batch method

A: β -butyrolactone, B: γ -butyrolactone, C: γ -nonalactone. S: sample introduction point. Experimental conditions: 3 ml introductions of a 0.5 M sodium hydroxide aqueous solution, 99.5% ethanol and 99.5% lactone(s) in order; chart speed, 40 mm/h; Range for the LUMI-FLOW detector, 0.1

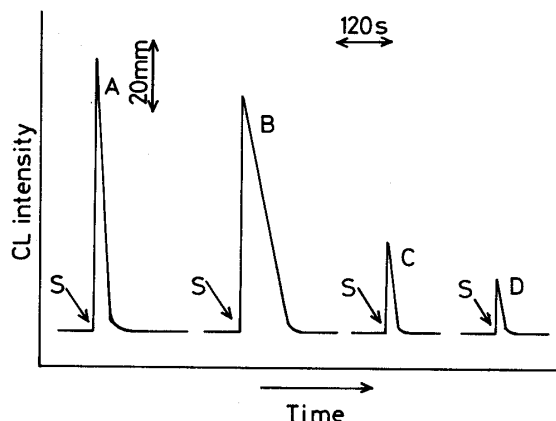


Fig. 3 Effect of alcohol on CL intensity by batch method

A: methanol, B: ethanol, C: 1-propanol, D: 1-butanol. S: sample (99.5% γ -butyrolactone) introduction point. Experimental conditions: same as for Fig. 2, except for alcohol

CL 強度が約 1.5 倍大きくなるのが認められた。この主な理由は水が生成したエステルを加水分解することによるエステル生成量の減少が生じる結果と思われる。以後、水酸化ナトリウムはエタノール溶液として調製した。

3.1.3 増感剤色素の選択と濃度 エオシン Y を用いた場合に最も大きな CL 強度が得られ、その場合は色素を用いない場合に比べて約 2 倍 CL 強度が増大した。以後、エオシン Y を実験に用いることとした。なお、エオシン Y/エタノール溶液の代わりにエオシン Y/メタノール溶液を用いた場合には、前記したようにメタノールの場合の CL 収率がエタノールの場合のそれより小さいので、メタノールの場合の CL 強度はエタノールの場合のそれより小さくなることも確かめた。次いで、エオシン Y の濃度 ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ エタノール溶液) について検討した。CL 強度は $1 \times 10^{-6} \sim 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ の範囲で濃度が高くなるに従って大きくなり、 $8 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ で一定となり、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以上の高濃度側では濃度が高くなるにつれて小さくなった。以上の結果から以後の実験には $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ エオシン Y を用いることとした。

3.2 超臨界流体 CL の基礎実験

3.2.1 各種ラク톤の CL 結果を Fig. 4 に示した。CL プロフィールの大きさは高さでは β -BuLac、面積では γ -BuLac が最大であった。これは水系の場合と同じ傾向を示した。

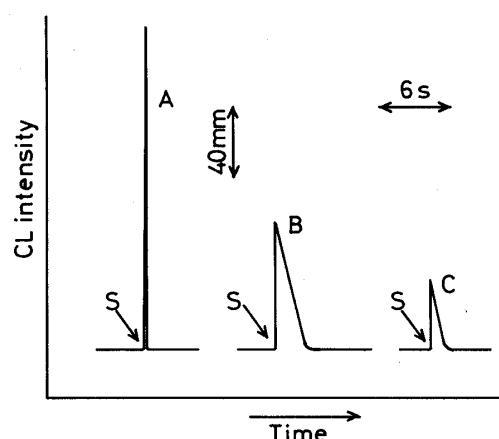


Fig. 4 CL profile for three kinds of lactone with a SCF-FIA/CL system

A: β -butyrolactone, B: γ -butyrolactone, C: γ -nonolactone. S: sample introduction point. Experimental conditions: a 1×10^{-2} M sodium hydroxide/ethanol solution for S_1 and 99.5% lactone sample for S_2 concerning the SCF-FIA/CL system; Chart speed, 18 cm/min; range for the LUMIFLOW detector, 0.1

3.2.2 試料溶媒 1×10^{-6} M γ -BuLac のアセトン溶液の場合に最も大きな CL 強度が得られ, 0.1 M γ -BuLac の場合はアセトンだけの場合の BG-CL と同じ CL 強度であった。0.1 M γ -BuLac のアセトン溶液で γ -BuLac の CL が確認できなくなった理由は定かでないが, BG-CL が変化しないことから BG-CL となるアセトンの励起体の生成量が減少するためでなく, SCF 中でのアセトンの励起体の生成量と多量の γ -BuLac との間に量的な何らかの関係, 例えば濃度消光に類似した現象があるためと考えられる。

エタノールと四塩化炭素については γ -BuLac の濃淡両濃度共にアセトンだけの場合の BG-CL 強度よりも小さくなり, CL がわずかに確認できる程度であった。この減光の理由として以下のことが考えられる。本 CL 反応は水系ではメタノールやエタノールのようなプロトン性の極性有機溶媒で効率よく進むが²²⁾, 有機溶媒系の場合には逆に非プロトン性で極性のある有機溶媒で効率よく進むこととなり, いわゆる有機溶媒特性が反映されるためと考えられる。特に本 CL 反応では試薬溶液にエタノールを溶媒として用いているので, 試料溶媒としてのアセトンの混入はプロトン性を低下させ, かつ極性を高める混合溶媒系が提供されることになる。その結果いっそう CL 強度が大きくなると考えられる。その逆がエタノールや四塩化炭素を試料溶媒として用いた場

合で, 結果は減光が起こることになると考えられる。このような有機溶媒特性は, エタノール/アセトン混合溶媒系で確かめられた。すなわち, BG-CL となるアセトンだけを試料注入器 S_2 から混入した場合には比較的大きな CL が生じるが, エタノールや四塩化炭素だけを混入した場合にはアセトンの場合のような BG-CL は全く得られない。その外, 一般的なエステル生成の場合と同様にラクトンからのジエステル生成の平衡系も関与することも考えられるが, 実験を超臨界流体中で行っている関係から安定度定数を測定する適当な手段がなく, 現状では仮定の域を出ない。詳細は現在検討中である。

以後, 試料の溶解性や CL 強度などを考慮してアセトンで試料を調製することとした。

3.3 増感剤色素

ウラニンは CO_2 超臨界流体を FIA のキャリアーとして用いると水系の場合と違って色素増感を示さなかった。他のエオシン Y などのキサンテン系色素にも同様な結果が認められた。ところで, 著者らは他の実験で CO_2 超臨界流体中で微量の水が介在した場合には色素増感が確認できている¹²⁾。この色素増感が水系で生じ, 超臨界流体中で生じない理由については現在明かでないが, 色素増感には水の介在が不可欠な要素 (例えば色素増感を発揮するには色素が CL 反応する場合にイオン性をもつなど) であるか, あるいは超臨界流体の溶媒特性によるかのいずれかと考えられる。

以上から超臨界流体では色素は用いないことにした。

3.4 CL プロフィール

従来の FIA/CL 分析システム(A)と SCF-FIA/CL 分析システム(B)によって得られたプロフィールを Fig. 5 に示した。CL プロフィールの形状は同じであったが, 超臨界流体の場合 γ -BuLac のほうが低濃度であっても CL 強度が増した。これは超臨界流体の高密度性により CL 収率が大きくなった結果と考えられる。

3.5 CL 反応の選択性

結果を Table 1 に相対 CL 強度で示した。表中の数値は γ -BuLac の CL 強度を 100 に定めた場合の相対値である。なお, 金属類はアセトンには溶けないが, あえてそれらの影響を検討するためにアセトンと水の混合液に金属類などを溶解することで検討した。Table 1 に示したように, ラクトン以外の他の化学種に CL は確認されず, ラクトンに高い選択性が認められた。

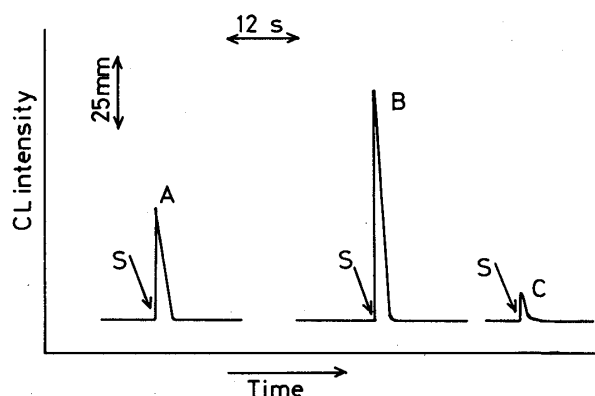


Fig. 5 Comparison of CL profile between a conventional FIA/CL method and the SCF-FIA/CL method

A: CL profile by a conventional FIA/CL method, B: CL profile by the SCF-FIA/CL method, C: background CL profile for acetone by the SCF-FIA/CL method. S: sample introduction point. Experimental conditions: Profile A, acetone carrier at flow rate of 6.0 ml/min and a 1×10^{-2} M sodium hydroxide/ethanol solution for S_1 and a 1×10^{-2} M γ -butyrolactone/acetone solution for S_2 ; Profile B, same as for profile A, except for CO_2 SCF carrier and 1×10^{-6} M γ -butyrolactone; Profile C (background CL for acetone), same as for Profile B; chart speed, 8 cm/min; range for the LUMI-FLOW detector, 0.1

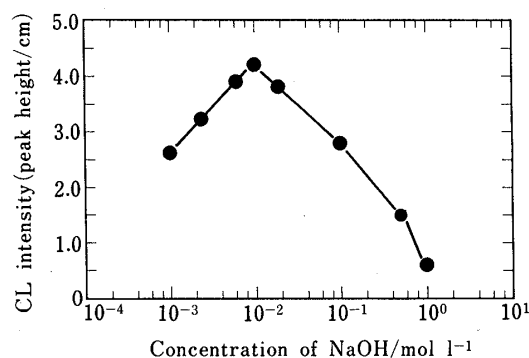


Fig. 6 Effect of concentration of sodium hydroxide on CL intensity

Experimental conditions: a sodium hydroxide/ethanol solution for S_1 and a 1×10^{-6} M γ -butyrolactone/acetone solution for S_2 at flow rate of 6.0 ml/min; range for the LUMI-FLOW detector, 0.1

3.6 最適操作条件

水酸化ナトリウム濃度の CL 強度への影響についての結果を Fig. 6 に示した。 1×10^{-2} M 水酸化ナトリウム

Table 1 Selectivity for the proposed CL reaction system

Compound (1×10^{-2} M)	Relative CL intensity
γ -Butyrolactone ^{a)} (acetone)	100
γ -Butyrolactone ^{a)} (acetone+water) ^{b)}	1
β -Butyrolactone ^{a)} (acetone)	330
γ -Nonalactone ^{a)} (acetone)	100
CH_3OH	13
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	13
Ascorbic acid ^{b)}	0
CH_3COOH ^{b)}	0
Oleic acid ^{b)}	0
CCl_4	8
Formalin	2
Oxalic acid dimethyl ester	18
Formic acid 1-butyl ester	18
$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ^{b)}	0
Na_2SO_4 ^{b)}	0
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ^{b)}	0
HgCl_2 ^{b)}	0
SnCl_2 ^{b)}	0
AlCl_3 ^{b)}	0
CoCl_2 ^{b)}	0
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ^{b)}	0
FeCl_3 ^{b)}	0
ZnSO_4 ^{b)}	0
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ^{b)}	0
MnCl_2 ^{b)}	0
MgCl_2 ^{b)}	0
CdCl_2 ^{b)}	0
KSCN ^{b)}	0
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ ^{b)}	0
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ^{b)}	0
KMnO_4 ^{b)}	0
None(acetone)	15
None(acetone+water) ^{b)}	0

a): 1×10^{-6} M; b): mixed solvent of acetone and water(9 : 1, v/v). Conditions: same as for Fig. 1

ム/エタノール溶液が最大 CL を呈した。以後、水酸化ナトリウム/エタノール溶液の濃度は 1×10^{-2} M とした。

次に流量と CL 強度の関係について調べた。1.0~6.0 ml/min までは CL 強度が徐々に大きくなる傾向にあり、6.0~9.0 ml/min までは減少の傾向にあることが分かった。従って最適流量は 6.0 ml/min とした。

以上から最適操作条件は Fig. 1 に示したとおりとした。

3.7 分析化学的特性

検出下限, 定量範囲, 他成分の影響及び再現性について

て検討した。

3・7・1 検出下限と定量範囲 最適分析条件下で入手した3種のラクトンの検量線を作成した。同様な結果が得られたので γ -BuLac を代表例として Fig. 7 に示した。 γ -BuLac の検出下限は 1.0×10^{-10} M (20 μ l 注入法: $S/N=2$) で、検量線の直線範囲(定量範囲)は $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ M であった。又 β -BuLac と γ -NonaLac の検出下限 (20 μ l 注入法: $S/N=2$) 及び定量範囲はそれぞれ以下のとおりであった。 β -BuLac: 0.5×10^{-10} M, $0.8 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ M; γ -NonaLac: 1.0×10^{-10} M, $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ M。なお、ラクトンの CL 検出の上限はいずれも 1.0×10^{-5} M であった。

本検量線はラクトン濃度が 1.0×10^{-7} M 以上になると CL 強度の減少が生じる。この理由は前述したとおりであるが、本検量線を実試料分析に適用する場合には、測定結果の正確さを検証するために試料を2種類調製(分析試料 I, 分析試料 I の 100 倍希釈試料 II)して用いる必要がある。分析試料 I と II に共に CL が確認された場合は分析試料 I が 1×10^{-7} M 以上のラクトンを含んでおり、この場合は分析試料 II の定量値を 100 倍して真の濃度を計算する。分析試料 I だけに CL が検出された場合は検量線より直接濃度を求める。

3・7・2 他成分の影響 結果を Table 2 に示した。相対 CL 強度は γ -BuLac だけの場合の CL 強度を 1 と定めたとき、他成分を含んだ場合の CL 強度が γ -BuLac だけの場合の 2.8 倍大きかった場合に、 γ -BuLac のみの CL 強度を 100 として他成分を含んだ場合の CL 強度を 280 として示した。なお、0 は CL が全く得られないことを示す。CL 反応の選択性を調べた場合と同

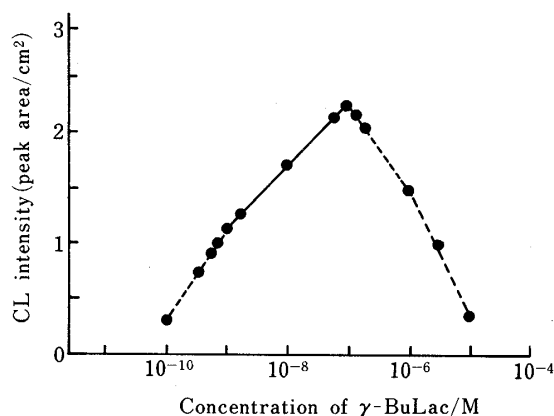


Fig. 7 Calibration graph for γ -butyrolactone
Experimental conditions: same as for Fig. 1

Table 2 Effect of various coexistent substances on the CL intensity

Compound (1.0×10^{-2} M)	Relative CL intensity
γ -Butyrolactone ^{a)} (acetone)	100
γ -Butyrolactone ^{a)} (acetone+water) ^{b)}	1
β -Butyrolactone ^{a)} (acetone)	280
γ -NonaLactone ^{a)} (acetone)	200
Pb(NO ₃) ₂ ^{b)}	0
FeCl ₃ ^{b)}	0
CoCl ₂ ^{b)}	0
Cu(NO ₃) ₂ ^{b)}	0
SnCl ₂ ^{b)}	0
Na ₂ C ₂ O ₄ ^{b)}	0
Na ₂ SO ₄ ^{b)}	0
MgCl ₂ ^{b)}	0
KSCN ^{b)}	0
Ni(NO ₃) ₂ ^{b)}	0
K ₂ Cr ₂ O ₇ ^{b)}	0
HgCl ₂ ^{b)}	0
AlCl ₃ ^{b)}	0
CdCl ₂ ^{b)}	0
K ₂ Cr ₂ O ₄ ^{b)}	0
ZnSO ₄ ^{b)}	0
MnCl ₂ ^{b)}	0
KMnO ₄ ^{b)}	0
CH ₃ OH	100
C ₂ H ₅ OH	100
1-C ₃ H ₇ OH	100
1-C ₄ H ₉ OH	100
Acetic acid ^{b)}	0
Ascorbic acid ^{b)}	0
Oleic acid ^{b)}	0
CCl ₄	100
Formalin	100
Oxalic acid dimethyl ester	101
Formic acid 1-butyl ester	100

a): 1.0×10^{-7} M; b): mixed solvent of acetone and water (9 : 1, v/v). Conditions: same as for Fig. 1, except for 20 μ l injections of the (1+1) mixed solutions with 1.0×10^{-7} M γ -butyrolactone and 1.0×10^{-2} M for other compounds

様の結果が得られ、本分析システムがラクトンに高選択的であることが分かった。

3・7・3 再現性と分析所要時間 20 μ l 注入法で 1×10^{-8} M γ -BuLac 溶液を 5 回繰り返し測定した場合の CL 強度の RSD は 5.5% であった。又、分析所要時間は CL プロフィールから計算して約 3 秒であった。

3・8 回収試験

回収試験用試料溶液を用いて得られた結果を Table 3

Table 3 Recovery test for γ -butyrolactone in coffee essence extracted with acetone

Sample	Taken/ M	Found/ M ^{a)}	RSD, % ^{b)}	Recovery, %
Original	0	ND ^{c)}	—	—
A	1.54	1.55	5.0	101
B	2.71	2.79	5.5	103
C	3.58	3.65	4.4	102
D	5.18	5.13	2.3	99
E	5.88	5.84	2.6	99

a): average for 5 repeated tests, b): relative standard deviation for 5 repeated runs, c): not detected.
Condition: same as for Fig. 1

に示した. いずれの場合もおおよそ 100% の回収結果が得られた.

3・9 CL 反応機構の一考察

本 CL 反応は前記したシュウ酸誘導体, 例えばシュウ酸ジエステルの過酸化水素との反応に準ずると考えられる. この考えに基づいて CL 反応機構を検討した.

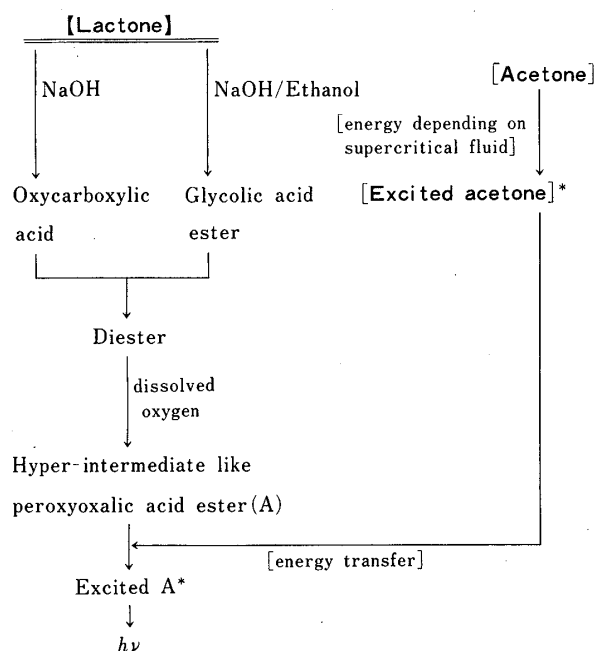
スペクトル解析に関しては, 超臨界流体中では比較的強い CL 強度が得られるがこの CL 特性を調べるための超臨界流体用スペクトル解析装置は現存しない. 一方, 水系ではスペクトル解析に利用できるに足る CL 強度が得られなかった. 又, 試薬調製直後と 10 分間放置後の可視・紫外吸収スペクトルには著しいパターンの違いは認められなかった.

カールフィッシャー法による水分定量では水の生成が確認できた. すなわち, エステルの生成が間接的に認められた.

本研究では過酸化水素は使用していないので, 過酸化水素に代わる酸化剤に溶存酸素が考えられる. そこで酸素を試薬溶液中に吹き込んで CL 強度を調べたところ, 酸素を吹き込まない試薬溶液の場合の CL 強度と比べて約 1.8 倍の大きさの CL 強度が得られた.

本 CL 反応の機構はスペクトル解析ができないことから現在のところ明らかにできないが, エステル生成の間接的確認及び酸素の関与する実験結果は CL 反応機構に関する著者らの考えを支持する一事実を含んでいるように思われる. 又, 著者らは他のラクトンに関する研究 (使用する試薬類は異なる)¹³⁾で, CO₂ 超臨界流体中にアセトンだけが存在しても強い CL が生じ, CO₂ ガス中ではそれは得られず, 更にアセトンの共存下で初めてラクトンの CL が得られることも確認している. こ

のことは本研究でラクトン/アセトン溶液を用いるとアセトンだけの場合と比べて CL 強度が大きくなった事実と対応がつく. すなわち, 試料溶媒のアセトンは BG-CL となるが, ラクトンの関与する CL を強めるための補助的役割を演じていることを示唆する結果と考えられる. 又, 超臨界流体中でこの効果が著しいのは (Fig. 5) 超臨界流体の高密度性が関与している結果と思われる. 従って本 CL 反応は Scheme 1 の反応順序で



Scheme 1 CL reaction

進むと思われる. 詳細についてはなお検討中である.

超臨界流体を CL 反応媒体として利用することで微量ラクトンの SCF-FIA/CL 定量法を確立できた. ラクトンなど香気成分は微量であるので, いっそうの高感度化も必要と考え更に検討したところ, 新たにラクトンの高感度分析に役立つ CL 反応系¹³⁾を見いだすことができた. 又本分析法は有機溶剤系には利用できるが, 利用範囲を広めるためには今後水溶液系にも利用できる SCF-FIA/CL 分析法の開発も必要と考える. これらについては現在研究中である. 超臨界流体の CL 分析への利用が益々図られることを期待する.

本研究の一部は文部省科学研究費重点領域研究 (課題番号 04238221) の資金援助により行われた.

(1991 年 11 月, 日本分析化学会)
第 40 年会にて一部発表

文 献

- 1) 赤星亮一: “香料の化学”, p. 281 (1985), (大日本図書).
- 2) A. Bernreuther, N. Christoph, P. Schreier: *J. Chromatogr.*, **481**, 363 (1989).
- 3) 化学大辞典編集委員会: “化学大辞典 9”, p. 520 (1962), (共立出版).
- 4) T. Tsuda, H. Nakanishi: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1532 (1983).
- 5) 石田 裕, 関根展子, 橋田修志, 藤居敏明, 木村茂, 関屋茂二: 食衛誌, **25**, 198 (1984).
- 6) 石井幹太, 山田正昭: ぶんせき, **1989**, 86.
- 7) M. Ishii, Y. Ohno, T. Hobo: *Anal. Sci.*, **7**, 873 (1991).
- 8) 石井幹太, 白井理子: 分析化学, **41**, 125 (1992).
- 9) 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬: 分析化学, **35**, 373 (1986).
- 10) T. Nakagama, M. Yamada, T. Hobo: *Anal. Chim. Acta*, **231**, 7 (1990).
- 11) Y. Ohno, T. Hobo, R. Tamura, M. Ishii: *Anal. Sci.*, **8**, 647 (1992).
- 12) 石井幹太, 白井理子: 日本分析化学会第 39 年会講演要旨集, p. 258 (1990).
- 13) 石井幹太, 内田英隆, 小池 充: 第 53 回分析化学討論会講演要旨集, p. 57 (1992).
- 14) 荒井康彦, 岩井芳夫: 化学と生物, **27**, 176 (1989).
- 15) 杉山謙吉: 現代化学, **32** (1985).
- 16) 化学大辞典編集委員会: “化学大辞典 9”, p. 518 (1962), (共立出版).
- 17) H. Watanabe, N. Mitsuhida, M. Andoh, M. Takeda, M. Maeda, A. Tsuji: *Anal. Sci.*, **2**, 461 (1986).
- 18) K. Imai, Y. Matsunaga, Y. Tsukamoto, A. Nishitani: *J. Chromatogr.*, **400**, 169 (1987).
- 19) C. Harris: *Talanta*, **19**, 1523 (1972).
- 20) 石井幹太, 馬場崎晋一, 高橋 亨: 第 52 回分析化学討論会, 講演要旨集, p. 415 (1991).
- 21) 神谷 功: “化学発光”, p. 179 (1972), (講談社).
- 22) 石井幹太, 三浦正年, 岡村嘉之: 日本化学会第 64 秋季年会, 講演予稿集 II, p. 866 (1992).



Determination of small amount of lactone by a supercritical fluid FIA with chemiluminescent detection. Mikita ISHII and Mitsuru KOIKE (Department of Industrial Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University, 1-1-1, Higashimita, Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 214)

By using a CO₂ supercritical fluid (SCF) as FIA carrier and chemiluminescent (CL) reaction medium, a SCF-FIA/CL system was developed in order to determine small amount of lactone. The system was comprised of a single flow line; and a cylinder for CO₂ SCF, high pressure pump, two injectors (Rheodyne 7125 : 100 μl for reagents; 20 μl for sample), detector and recorder which were set up on the line, in order. A CL is produced as follows. Lactone reacts with sodium hydroxide and sodium hydroxide/ethanol, and changes to oxycarboxylic acid and glycolic acid ester, respectively. These two compounds react with each other, and the diester is finally produced. The diester reacts with dissolved oxygen, and a hypercompound, such as peroxide of oxalic acid diester is produced. The exited compound being a CL emitter produces the CL and the CL is enhanced in SCF. Analytical characteristics for γ-butyrolactone (γ-BuLac) as a representative were as follows. Lower detection limit: 1.0×10^{-10} M (20 μl injection method: $S/N=2$). Linearity of the calibration: $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ M. Selectivity: excellent to lactone. Reproducibility: 5.5% in terms of relative standard deviation (5 repeated runs for 1×10^{-8} M γ-BuLac in 20 μl injection volume). Analytical time required: ca. 3 s. Recovery test for γ-BuLac in coffee essence was successfully achieved.

(Received October 8, 1992)

Keyword phrases

supercritical fluid FIA; chemiluminescent determination of small amount of lactone.