

報 文

陽イオン交換膜サプレッサーによる電気伝導度減少を利用する
酢酸、吉草酸、乳酸及びギ酸のイオンクロマトグラフィー三浦 恭之[®], 大野 寛和, 康 智 三^{*}

(1994 年 3 月 28 日受理)

樹脂ベースのイオン交換カラム (直列に接続した HPIC-AG4A と HPIC-AS4A) に対し pH 4.3 の 5×10^{-4} M リン酸塩溶離液を用いることにより, 酢酸, 吉草酸, 乳酸及びギ酸を完全に溶出分離することができた. 分離カラムからの溶出液を H^+ 型陽イオン交換膜サプレッサーに通すことにより, カルボン酸塩試料の電気伝導度は減少すると同時にバックグラウンドは増大した. その結果, カルボン酸を高感度に定量することができた. $S/N=2$ としたときの各カルボン酸の検出限界は酢酸が 14.2 ppb, 吉草酸が 40.5 ppb, 乳酸が 45.4 ppb 及びギ酸が 30.6 ppb であった. 各カルボン酸の検量線は, 酢酸が 3.5×10^{-4} M ($M = \text{mol dm}^{-3}$), 吉草酸が 4.5×10^{-4} M, 乳酸が 2.5×10^{-4} M 及びギ酸が 4.0×10^{-4} M まで濃度とピークの高さとの間に良好な直線関係を示した. 本法を食品中の乳酸の定量に応用したところ, 満足な結果が得られた.

1 緒 言

脂肪族カルボン酸の液体クロマトグラフィーでは, 目的成分は固定相と移動相の間での吸着・分配, イオン排除及びイオン交換などの相互作用によって分離され, 一般には吸光度及び電気伝導度検出される. 脂肪族カルボン酸を吸光度検出する場合, カルボン酸を臭化フェナシールと反応させるなどして光吸収を示す化学種に変えることが必要であり, 前処理操作が煩雑である^{1)~4)}. 電気伝導度検出法では, 溶離液として希硫酸⁵⁾や希塩酸⁶⁾を用いるイオン排除クロマトグラフィーが報告されているが, 高いバックグラウンドのためカルボン酸の定量感度は低い. 塩酸溶離液の使用については, 分離カラムからの溶出液を Ag^+ 型陽イオン交換カラムサプレッサー⁶⁾に通すことによりバックグラウンドを低下させたが, 生成した塩化銀はサプレッサーカラムの目詰まりを生じてバックプレッシャーを高くする原因になった. 又, 低いバックグラウンドを示す溶離液として炭酸溶液⁷⁾が使用された. 電気伝導度検出イオン交換クロマトグラフィーではホウ酸塩⁸⁾, フタル酸塩⁹⁾¹⁰⁾, 水酸化ナトリウム¹¹⁾及び炭酸塩¹¹⁾などの溶離液を用いる酢酸とギ酸⁸⁾¹¹⁾及び酢酸と乳酸⁹⁾¹⁰⁾の分離・定量が報告されている. 一方, 星野ら¹²⁾はシリカベースのイオン交換

カラムとフタル酸塩溶離液を用いることにより, 酢酸, 乳酸, ギ酸, コハク酸及び安息香酸を分離・定量した. しかし, 相互に共存する, 酢酸, 吉草酸, 乳酸及びギ酸の分離・定量法は報告されていない. 本研究ではポリマー基材陰イオン交換カラムを用い, 低級脂肪族カルボン酸の溶出分離に対する溶離液の効果を検討した. その結果, 5×10^{-4} M リン酸塩溶離液 (pH 4.3) が酢酸, 吉草酸, 乳酸及びギ酸を良好に溶出分離することが分かった. 又, 各カルボン酸の定量感度は分離カラムからの溶出液を H^+ 型陽イオン交換膜サプレッサーに通すことにより大幅に増大することが分かった.

2 実 験

2.1 装 置

本実験には送液ポンプ, 50 μ l のサンプルループ付きの試料注入バルブ, Dionex 製のスチレン-ジビニルベンゼン共重合陰イオン交換樹脂 (粒径 15 μ m) の HPIC-AG4A ガードカラム (50 mm $\times$ 4 mm i.d.) にこれと同じイオン交換樹脂の HPIC-AS4A カラム (250 mm $\times$ 4 mm i.d.) を直列に接続した分離カラム及び Dionex 製の H^+ 型陽イオン交換膜サプレッサーから成る Dionex 4000i 型イオンクロマトグラフ装置を使用した. 電気伝導度の測定は島津 CDD-6A 型電気伝導度検出器を用いて行い, 島津 R-111 型レコーダーで記録した.

* 東海大学理学部化学教室: 259-12 神奈川県平塚市北金目 1117

2・2 試 薬

本実験では市販の特級試薬をそのまま使用した。水は再蒸留水を更に日本ミリポア製の MilliQ-II で処理して用いた。溶離液は pH を調節した後、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターで濾過して使用した。

酢酸塩、吉草酸塩、乳酸塩及びギ酸塩の標準溶液：各カルボン酸溶液（約 0.1 M, $M = \text{mol dm}^{-3}$ ）はフェノールフタレイン指示薬と 0.1 M 水酸化ナトリウム標準溶液を用いて標定した。カルボン酸ナトリウム標準溶液（0.01 M）は 0.02 M カルボン酸標準溶液のそれぞれ 100 ml に対し当量の水酸化ナトリウムを加えて全量を 200 ml に希釈することによって調製した。実験にはこれらの溶液を適宜希釈して用いた。

リン酸塩溶離液：0.5 M リン酸溶液はリン酸（85%）8.55 ml を 250 ml に希釈することにより、又 0.5 M リン酸二水素ナトリウム溶液は $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （99%）19.70 g を水に溶かして 250 ml に希釈することによってそれぞれの溶液を調製した。溶離液の pH は同じモル濃度のリン酸溶液とリン酸二水素ナトリウム溶液を種々の体積比で混合することによって調節した。定量操作で使用した 5×10^{-4} M リン酸塩溶離液（pH 4.3）は 5×10^{-4} M リン酸溶液 34.0 ml と 5×10^{-4} M リン酸二水素ナトリウム溶液 510 ml を混合して調製した。

2・3 操 作

溶離液としては 5×10^{-4} M リン酸塩溶液（pH 4.3）を毎分 0.8 ml の流量で流し、ベースラインを安定化させる。次に酢酸、吉草酸、乳酸及びギ酸を含む試料溶液 50 μl を注入すると、各カルボン酸は直列に接続した HPIC-AG4A と HPIC-AS4A カラムによって分離され、その後 H^+ 型陽イオン交換膜サプレッサーを通る。この陽イオン交換膜サプレッサーには再生液として 0.025 M 硫酸を毎分 1.5 ml の流量で流す。電気伝導度を測定（23°C）してチャート紙に記録する。

3 結果と考察

3・1 溶離剤の効果

直列に接続した HPIC-AG4A と HPIC-AS4A を分離カラムとして使用し、酢酸、吉草酸、乳酸及びギ酸を溶出分離する際の種々の溶離剤の効果を検討した。その結果を Table 1 に示す。 5×10^{-4} M 安息香酸塩溶離液は各カルボン酸を早く溶出して分離することができなかった。そこで安息香酸塩溶離液の濃度を 1×10^{-4} M にまで低くしたが、各カルボン酸はブロードなピークを示し、それぞれを分離することもできなかった。ホウ酸塩

Table 1 Retention times of carboxylic acids with various eluents

Acid	Retention time (t')/min		
	5×10^{-4} M benzoate (pH 5.5)	1×10^{-3} M phosphate (pH 4.3)	1×10^{-3} M borate (pH 9.0)
Acetic acid	2.47	1.85	3.42
Valeric acid	2.75	2.35	4.58
Lactic acid	2.75	4.69	3.23
Formic acid	2.71	7.13	4.38

は安息香酸塩及びリン酸塩に比較して溶離能が弱いいため、各カルボン酸を遅く溶出した。ホウ酸塩溶離液の濃度を 1×10^{-2} M にまで高くしても良好な結果は得られなかった。これに対し、 1×10^{-3} M リン酸塩溶離液を使用したとき、酢酸、吉草酸、乳酸及びギ酸を完全に溶出分離することができた。その他、種々の濃度の水酸化ナトリウム溶液、炭酸水素塩溶液（pH 8.3）及び酒石酸塩溶液（pH 3.8）を使用したか、カルボン酸混合物を分離することはできず、リン酸塩溶離液ほど良好なクロマトグラムを得ることができなかった。酸性の溶離液はカルボン酸を酢酸、吉草酸、乳酸及びギ酸の順序で溶出したが、塩基性溶離液のホウ酸塩溶液、水酸化ナトリウム溶液及び炭酸水素塩溶液は乳酸、酢酸、ギ酸及び吉草酸の順に溶出した。そこで、2・3 の操作ではリン酸塩溶離剤を使用することにした。

3・2 リン酸塩溶離液の pH の効果

4 種のカルボン酸混合物の溶出分離に対する 1×10^{-3} M リン酸塩溶離液の pH 効果を検討した。その結果を Fig. 1 に示す。リン酸塩溶離液の pH が高くなると溶離能が強くなるため、塩化物イオンは早く溶出された。しかし、酢酸と吉草酸の溶出は遅くなった。これは pH の増大に伴って酢酸と吉草酸の解離が促進され、酢酸と吉草酸のカラムへの保持が増大するためと考えられる。ギ酸と乳酸は pH 4.1 までは溶出が遅くなったが、更に高い pH 領域では早く溶出された。リン酸塩溶離液の pH が 4.1 から 4.4 の範囲内で各カルボン酸は完全に溶出分離されたことから、2・3 の操作ではリン酸塩溶離液の pH を 4.3 に調節した。

3・3 リン酸塩溶離液（pH 4.3）の濃度の効果

リン酸塩溶離液（pH 4.3）のモル濃度の対数と各カルボン酸と塩化物イオンの保持時間の対数（ $\log t'$ ）の関係を Fig. 2 に示す。塩化物イオンは -1 の傾きの直線を

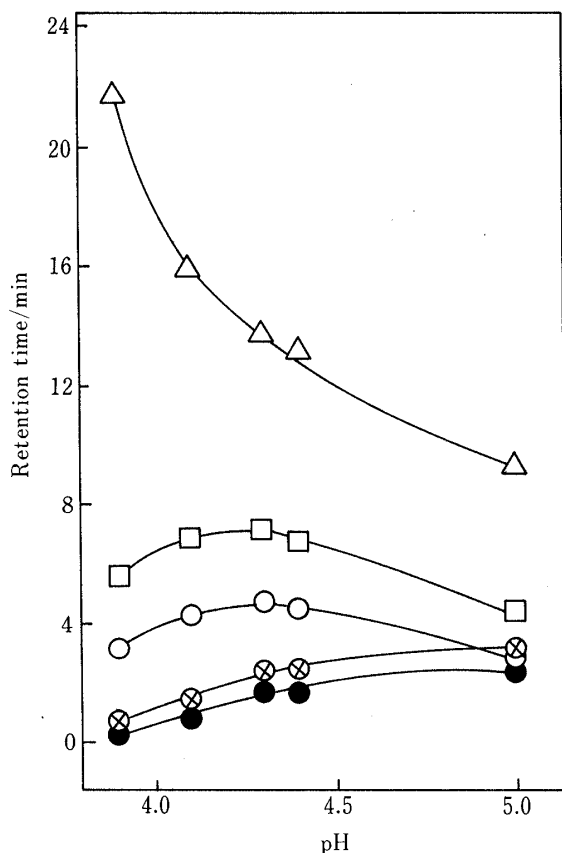


Fig. 1 Effect of pH of a 1×10^{-3} M phosphate eluent on the retention times of carboxylic acids and chloride

△: chloride; □: formic acid; ○: lactic acid; ⊗: valeric acid; ●: acetic acid

示し、イオン交換反応によって溶出分離されることが分かった。これに対し、各カルボン酸は曲線を示しイオン交換や樹脂への吸着・分配等の相互作用によって溶出分離されるものと考えられる。 5×10^{-4} M リン酸塩溶離液を使用することにより、4 種のカルボン酸は 13 分間以内に完全に溶出分離されてシャープなピークを示した。以上のことから、2・3 の操作では 5×10^{-4} M リン酸塩溶離液 (pH 4.3) を使用することにした。

3・4 カルボン酸の検出感度の増大

著者らは H^+ 型陽イオン交換膜カラムが塩基性の溶離液だけでなく弱酸性の溶離液を用いたときも試料イオンの検出感度を大幅に向上させることを報告した¹³⁾¹⁴⁾。本実験では、 H^+ 型陽イオン交換膜サプレッサーによって溶離液中の陽イオンを水素イオンに交換し、 5×10^{-4} M リン酸塩溶離液の pH は 4.3 から 3.3 にまで低下させることができた。その結果、バックグラ

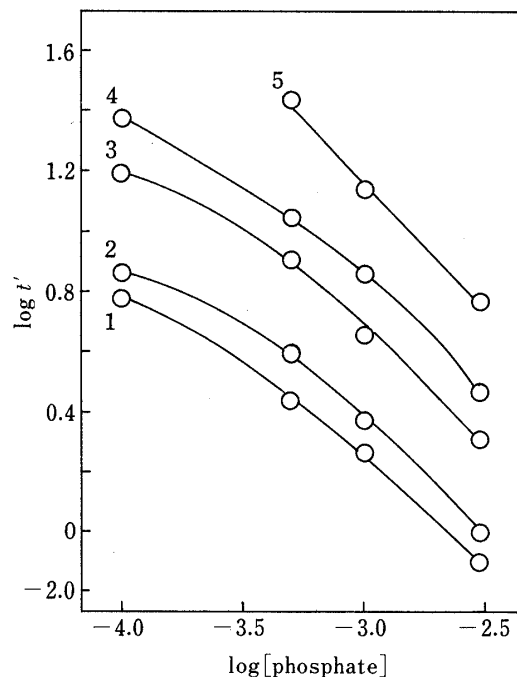


Fig. 2 Effect of concentration of phosphate eluent (pH 4.3) on the retention times of carboxylic acids and chloride

1: acetic acid; 2: valeric acid; 3: lactic acid; 4: formic acid; 5: chloride

ウンドは 56.0 から $283 \mu S/cm$ に増大し同時にカルボン酸化学種はそれぞれ非解離型の分子に変えられ、負のピークを示した (Fig. 3)。陽イオン交換膜サプレッサーを使用することにより、各カルボン酸のピークの高さはそれを使用しないときに比較して大幅に増大することができた。陽イオン交換膜サプレッサーの再生液 (硫酸) の濃度の効果を検討した結果、硫酸の濃度が $0.001 \sim 0.05$ M の範囲内でバックグラウンド及び各カルボン酸のピークの高さは有意の変化を受けなかった。以上のことから、2・3 の操作では再生液として 0.025 M 硫酸を使用することにした。

3・5 検量線

2・3 の操作に従って得られた酢酸、吉草酸、乳酸及びギ酸の検量線を作成した。各カルボン酸の検量線は、酢酸が 3.5×10^{-4} M、吉草酸が 4.5×10^{-4} M、乳酸が 2.5×10^{-4} M 及びギ酸が 4.0×10^{-4} M まで濃度とピークの高さとの間に良好な直線関係を示した。各検量線の相関係数、感度及び検出限界を Table 2 に示す。 3.00×10^{-4} M 酢酸、 3.00×10^{-4} M 吉草酸、 2.00×10^{-4} M 乳酸及び 3.00×10^{-4} M ギ酸の標準混合試料を用い 6

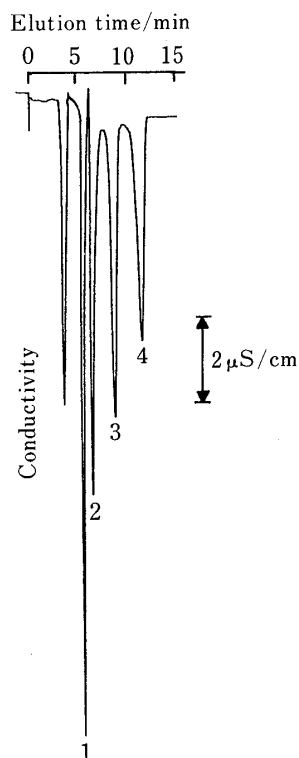


Fig. 3 Chromatograms of four carboxylic acids in a mixture using a cation-exchange micro membrane suppressor in H^+ form

1: 2.5×10^{-4} M acetic acid; 2: 2.5×10^{-4} M valeric acid; 3: 2.5×10^{-4} M lactic acid; 4: 2.5×10^{-4} M formic acid

回繰り返し実験を行って本法の精度を検討した。その結果、酢酸については平均値が 2.98×10^{-4} M で、標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (RSD) はそれぞれ $4.8 \times$

Table 2 Correlation coefficient, sensitivity and detection limit for each calibration graph of carboxylic acids

Carboxylic acid	Correlation coefficient	Sensitivity ($\mu S cm^{-1} / 10^{-4} M$)	Detection limit (as $S/N=2$) (ppb)
Acetic acid	0.9999	5.84	14.2
Valeric acid	0.9999	3.52	40.5
Lactic acid	0.9998	2.74	45.4
Formic acid	0.9990	2.06	30.6

10^{-6} M と 1.6%, 吉草酸については平均値が 3.00×10^{-4} M ($SD=4.0 \times 10^{-6}$ M, $RSD=1.3\%$), 乳酸については平均値が 2.05×10^{-4} M ($SD=5.2 \times 10^{-6}$ M, $RSD=2.5\%$) とギ酸については平均値が 3.06×10^{-4} M ($SD=7.1 \times 10^{-6}$ M, $RSD=2.3\%$) であった。

3・6 実試料への応用

本法を実試料に適用するにあたって種々の化学種の溶出時間を検討した。その結果、プロピオン酸と酪酸は酢酸とほとんど同じ溶出時間で溶出された。シュウ酸、リンゴ酸、コハク酸、マロン酸と酒石酸のカルボン酸及び無機陰イオンの塩化物イオン、亜硝酸イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオンはギ酸の溶出よりも遅いために妨害を与えなかった。本法をワイン、日本酒、食酢及び清涼飲料水中の乳酸イオンの定量に応用した結果を Table 3 に示す。各試料中の乳酸の定量値は添加実験による結果とよく一致した。又、乳酸の添加回収率は 95.2~105.3% で満足な結果が得られた。本法は食品中の乳酸の定量に応用できることが分かった。

Table 3 Determination of lactic acid in food samples

Sample	Lactic acid				Recovery, %
	Dilution/fold	Added/ 10^{-4} M	Found/ 10^{-4} M	Found in sample/ 10^{-2} M	
Wine	20		5.50	1.10	
	35	1.00	4.13	1.10	99.7
	45	1.50	4.00	1.13	102.5
Japanese sake	20		5.40	1.08	
	35	0.50	3.60	1.09	100.3
	45	1.50	3.97	1.11	102.9
Soft drink	20		0.63	0.13	
	10	1.50	2.78	0.13	101.6
	25	1.50	1.98	0.12	95.2
Vinegar	400		1.33	5.32	
	400	2.00	3.40	5.60	105.3

文 献

- 1) E. Mentasti, M. C. Gennaro, C. Sarzanini, C. Baiocchi, M. Savigliano: *J. Chromatogr.*, **322**, 177 (1985).
- 2) F. Caccamo, G. Carfagnini, A. D. Corcia, R. Samperi: *J. Chromatogr.*, **362**, 47 (1986).
- 3) R. M. Marce, M. Calull, J. C. Olucha, F. Borrull, F. X. Rius: *Anal. Chim. Acta*, **242**, 25 (1991).
- 4) R. M. Marce, M. Calull, J. C. Olucha, F. X. Rius, J. Zupan: *Anal. Chim. Acta*, **259**, 237 (1992).
- 5) K. Tanaka, J.S. Fritz: *J. Chromatogr.*, **361**, 151 (1986).
- 6) D. T. Gjerde, J. S. Fritz: "*Ion Chromatography*", 2nd., p. 241 (1987), (Hüthing, Heidelberg).
- 7) H. Itoh, Y. Shinbori: *Chem. Lett.*, **1982**, 2001.
- 8) 田中 茂, 井口 勝, 山口一夫, 山田知行, 中尾直人, 橋本芳一: 分析化学, **36**, 12 (1987).
- 9) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **31**, 317 (1985).
- 10) 鈴木義仁, 小泉 均, 谷 和江, 丁 明玉: 分析化学, **40**, T15 (1991).
- 11) S. A. Bouyoucos: *J. Chromatogr.*, **242**, 170 (1982).
- 12) 星野洋右, 斉藤浩子, 及川紀久雄: 分析化学, **32**, 273 (1983).
- 13) 三浦恭之, 米村康信, 康 智三: 日化, **1991**, 1083.
- 14) 三浦恭之, 康 智三: 分析化学, **41**, 331 (1992).



Ion chromatographic determination of acetic, valeric, lactic and formic acids by means of decrease in their conductivity with cation-exchange micro membrane suppressor in hydronium form. Yasuyuki MIURA, Hirokazu OHNO and Tomozo KOH (Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokai University, 1117, Kitakaname, Hiratsuka-shi, Kanagawa 259-12)

Four carboxylic acids, acetic, valeric, lactic and formic acids were separated completely by elution with a 5×10^{-4} M phosphate eluent (pH 4.3) in an ion chromatography using resin-based ion-exchange columns (Dionex HPIC-AG4A and HPIC-AS4A) in series. The eluent was flowed at a rate of 0.8 ml/min and a conductivity detector was used. The sensitive determination of these carboxylic acids was achieved by use of a cation-exchange micro membrane suppressor in H^+ form, in which each carboxylate species was converted into its acid molecule and the sodium dihydrogenphosphate eluent into ionized phosphoric acid ($H_2PO_4^-$ and H^+). The chromatograms obtained for the carboxylic acids showed negative peaks based on a decrease in the conductivity from the background level. When a 50 μ l sample solution was injected, the observed detection limits at $S/N=2$ were 14.2 ppb for acetic acid, 40.5 ppb for valeric acid, 45.4 ppb for lactic acid and 30.6 ppb for formic acid. The proposed method proved to be applicable to the determination of lactic acid in various food samples.

(Received March 28, 1994)

Keyword phrases

suppressed ion chromatography; carboxylic acids; phosphate eluent; determination of lactic acid; food analysis.