

イオン分析への透析法の適用

インラインダイアリシス—イオンクロマトグラフィー

小林 泰之, 山本 喬久

1 はじめに

イオンクロマトグラフィー (IC) は、水試料中の無機イオンの測定に広く利用されてきたが、近年は工業原料・材料、食品、生体等の中の無機イオンの定量にも使用されている。これらの試料中には、疎水性有機化合物、高分子化合物、タンパク質、脂質、界面活性剤、色素、重金属等の夾雑成分が高濃度に含まれている。これらの夾雑成分は、保持時間変動やピーク形状の変形等を引き起こし、ときにはカラム充填剤に吸着・蓄積してカラム性能を低下させてしまうこともある。したがって、前処理により夾雑成分を事前に除去しなければならない。

疎水性有機化合物や重金属等の除去には、主に固相抽出法 (Solid Phase Extraction: SPE) が使用されている¹⁾。SPE の適用範囲は広いが、水溶性の高い有機化合物や高分子を取り除くことは困難である。また、SPE カートリッジからは数十 $\mu\text{g/L}$ から数 mg/L もの塩化物イオンや硫酸イオンが溶出して、試料汚染を引き起こしてしまう。さらに、オフライン処理のため、試料容器や測定環境からの汚染も無視することはできない。

水溶性高分子と無機イオンとの分離には透析法 (ダイアリシス法) が有効である。透析は、半透膜で隔てられた二液相間での濃度差に基づく物質移動を利用したもので、タンパク質の脱塩・精製や血液透析等に利用されている。例えば、セロファン膜の中にタンパク質溶液を入れて純水中に浸けて置くと、溶液中のイオンは半透膜を通過して純水中に移行する。透析平衡に達した時、純水中のイオン濃度と元液中の残存イオン濃度は同じになる。純水を交換して再度透析すれば、元液中のイオン濃度をさらに半分にできる。この操作を数回繰り返すことによりタンパク質溶液の脱塩・精製ができる。

逆の視点から見ると、透析法は水溶性高分子の除去に利用できる。前記タンパク質溶液の吸収液 (acceptor) である純水を測定試料として IC で測定すれば、タンパク質の妨害を受けずにイオン分析が可能となる。

Metrohm では、インライン前処理-IC システムの構築に関して検討を行ってきた²⁾³⁾。前処理のインライン

化により、オフライン処理で深刻な問題となる汚染を解消できると共に、操作性の向上、省力化、自動化も可能となる。透析法のインライン化に関しても検討も行い、食肉加工品抽出液中の陰イオン⁴⁾、食品や健康飲料等の中の保存料⁵⁾の測定に応用した。本稿では、インラインダイアリシス-IC の無機イオン分析への適用性について紹介する。

2 インラインダイアリシス-IC システム

図 1 に、Metrohm の透析セルの構造を示す。ドナーチャンバとアクセプタチャンバの構造はほぼ同じで、それぞれに渦巻き状の流路が形成されている。流路の容量は、240 μL (標準) のものと 60 μL (低容量) の 2 種類がある。通常、透析膜には孔径 0.2 μm の酢酸セルロール系メンブランフィルタを用いる。透析膜の孔径や材質は、試料溶液の特性に応じて変更可能である。

図 2 に、陰イオン分析用のインラインダイアリシス-IC システムの構成を示す。イオンクロマトグラフには、Metrohm 858 Professional Sample Processor を接続した Metrohm 940 Professional IC Vario を用いた。なお、陽イオン分析は、サブプレッサ及び CO_2 サブプレッサを使用しないノンサブプレスト式 IC で行った。

測定試料の透析処理は次の手順で行う。アクセプタチャンバの流路に吸収液である純水を封入し、ドナーチャンバの流路には試料溶液を一定流量 (通常、0.3~0.5 mL/min) で送液する。拡散係数の大きいイオンは透析膜を通過して吸収液側に移行する。試料溶液が停止している場合には透析後の吸収液中のイオン濃度は試料

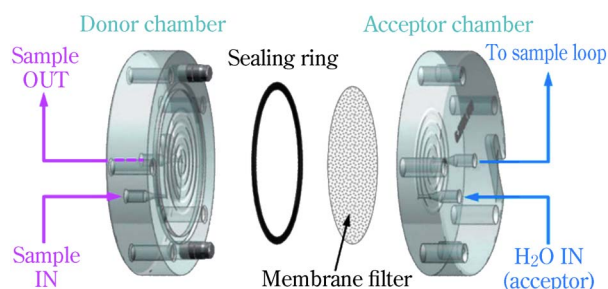


図 1 透析セルの構造

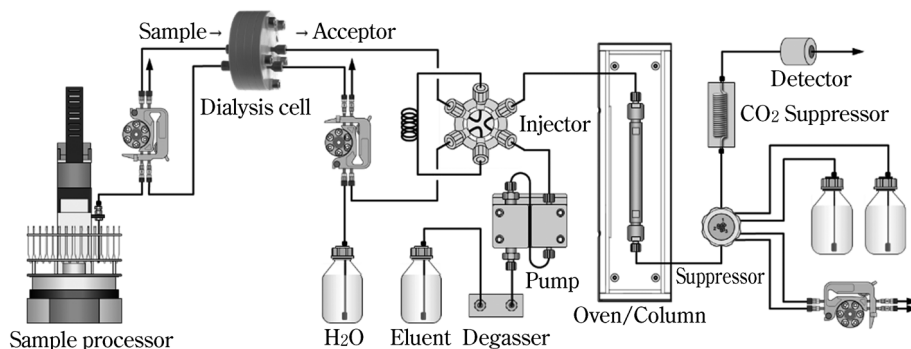


図2 インラインダイアリシス-IC システムの構成

元液の半分の濃度であるが、試料溶液を送液し続けた場合には吸収液中のイオン濃度は試料元液と同一濃度になる。試料元液と同一濃度になるまでの時間（＝透析平衡に達するまでの時間）は、測定対象イオンや試料中の夾雑成分の種類や濃度に依存するため、事前評価を行って設定しておく。標準透析セルを用いる場合、吸収液を純水として、試料送液流量 0.3～0.5 mL/min で陰イオンを透析すると 8～10 min で透析平衡に達する。この条件では 5 mL 以上の試料送液が必要となるが、小量試料の測定には低容量透析セルで対応できる。低容量透析セルの流路幅・深さは標準透析セルの 1/2 であるので、試料送液流量を 1/4 にすることができる。透析平衡に達した後、試料溶液の送液を停止し、アクセプタチャンバの流路に封入されていた吸収液をサンプルループに送液して IC で測定を行う。

ビールを試料として、インラインダイアリシス-IC の評価を行った。図 3 に、純水で 25 倍希釈したビール中の陰イオンのクロマトグラムを示す。試料送液流量は 0.5 mL/min で、透析時間は 10 min とした。また、表 1 に、定量値、相対標準偏差及び添加回収率を示す。ビール中からは、塩化物イオン、硝酸イオン、リン酸イオン及び硫酸イオンが検出され、4 種陰イオンの繰り返し再現性は 1 % 以下と良好であった。硝酸イオンを除き、添加回収率も良好であった。硝酸イオンの添加回収率は、透析処理をせずに直接注入した場合でも 82 % であり、試料中の夾雑成分が添加回収率の低下原因であると推定される。

3 インラインダイアリシス-IC の応用

3.1 食肉加工品中の亜硝酸イオン及び硝酸イオンの測定

食肉加工において、亜硝酸塩は発色剤として広く使用されている。アミン類と同時に亜硝酸塩を摂取すると、胃酸により発がん物質であるニトロソアミンが生成するとされる。我が国では、食品衛生法施行規則において成分規格基準値が決められており、亜硝酸イオンの測定は重要である。しかし、食肉加工品中にはタンパク質、脂

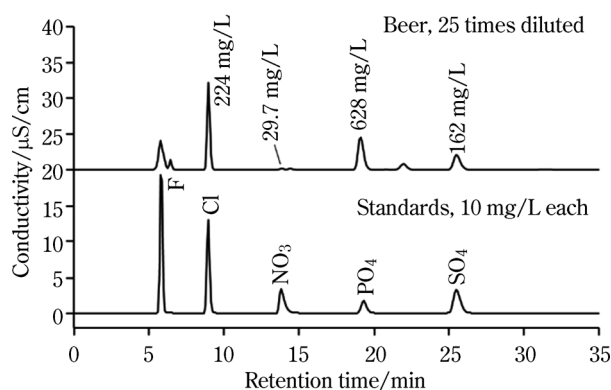


図3 ビール中の陰イオンのクロマトグラム
カラム, Metrosep A Supp 5-50+Metrosep A Supp 1-250/4.6; 溶離液, 3.6 mM Na₂CO₃, 0.7 mL/min; 温度, 30 °C; 注入量, 20 μL.

表1 ビール中陰イオンの定量値、相対標準偏差及び添加回収率

陰イオン	Cl	NO ₃	PO ₄	SO ₄
定量値, mg/L	224.34	29.41	630.03	162.24
繰り返し再現性, %	0.14	0.95	0.24	0.26
測定値, mg/L	9.04	0.88	24.79	8.76
添加濃度, mg/L	2	2	2	2
観測値, mg/L	10.97	2.36	26.92	10.85
添加回収率, %	96.5	74.0	106.6	104.5

* 定量値及び相対標準偏差は 6 回測定における平均値。

質の他、種々の有機化合物が多数含まれている。また、塩化物イオン濃度も非常に高く、亜硝酸イオンの定量精度を低下させてしまう恐れがある。

図 4 に、インラインダイアリシス-IC によるソーセージ中の陰イオンのクロマトグラムを示す。ソーセージは細切後 5 g を採取し、水/エタノール (4:1) を加えてホモジナイズし、100 mL に定容した。遠心分離後、上澄を測定に供した。試料送液流量は 0.5 mL/min で、透析時間は 8 min とした。ソーセージ中からは 1 mg/L レベルの亜硝酸イオン及び硝酸イオンが検出された。亜硝酸イオンは塩化物イオンの大きなピークの裾に

溶出したが、紫外吸収検出器 UVD を併用することで塩化物イオンによる妨害を解消することができた。亜硝酸イオン及び硝酸イオンの繰り返し再現性 (RSD, $n=10$) は、UVD でそれぞれ 1.57 % 及び 2.43 % であった。また、50 回の連続測定時における亜硝酸イオン及び硝酸イオンの繰り返し再現性 (RSD) は、UVD でそれぞれ 2.45 % 及び 2.53 % であった。

亜硝酸イオン及び硝酸イオンの定量には銅・カドミウムカラム還元-吸光光度法が広く利用されてきた。そこで、吸光光度法とインラインダイアリシス-IC により得られた定量値の相関を調べた。しかし、従来法では測定廃液の有害性が問題となるため、ここでは硝酸還元酵素を利用する吸光光度法を用いた。試料には、前述のソーセージの他、合計 9 種の食肉加工品を用いた。結果を図 5 に示すが、亜硝酸イオン及び硝酸イオンの相関係数 R は、それぞれ 0.9897 及び 0.9629 と良好な結果で

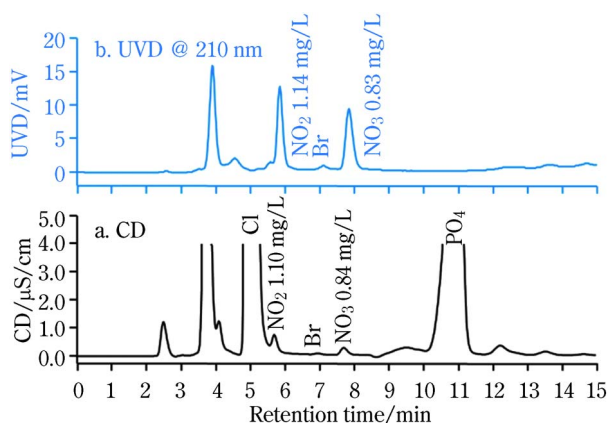


図 4 ソーセージ中の陰イオンのクロマトグラム
カラム, Metrosep A Supp 4-250/4.0 ; 溶離液, 1.8 mM Na_2CO_3 /1.7 mM NaHCO_3 , 1.0 mL/min ; 温度, 40 °C ; 注入量, 20 μL .

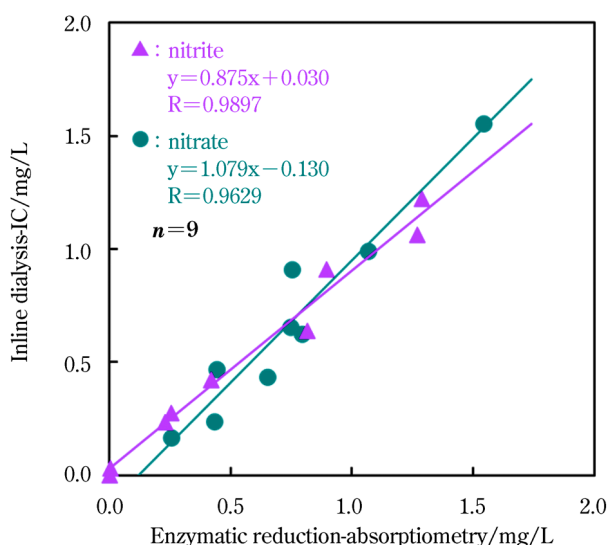


図 5 食肉加工品中の亜硝酸イオン及び硝酸イオンの定量値の酵素還元-吸光光度法とダイアリシス-IC との相関

あった。硝酸イオンの回帰線の切片が若干大きかったが、傾きは 1.079 と良好な相関を示すことが判明した。

3.2 乳製品中の陰イオン及び陽イオンの定量

乳製品中には乳タンパクや脂質、乳化剤等が含まれ、これらがカラム充填剤に吸着・蓄積すると分離カラムの性能低下を引き起こされる。

図 6 に、無乳糖ミルク (乳脂肪分 3.5 %) 中の陽イオンのクロマトグラムを示す。無乳糖ミルクを純水で 100 倍希釈し、インラインダイアリシス-IC に供した。吸収液には 2 mM HNO_3 を用い、試料送液流量は 0.5 mL/min, 透析時間は 2 min とした。ミルク中夾雑成分の妨害を受けずに、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンの定量が可能で、4 種イオンの繰り返し再現性 (RSD, $n=4$) は 1.2 % 以下であった。

図 7 に、チーズ中の陰イオンのクロマトグラムを示す。チーズに 10 倍量の純水を加えてホモジナイズし、遠心分離後、上澄を採取してインラインダイアリシス-IC に供した。試料送液流量は 0.5 mL/min とし、透析

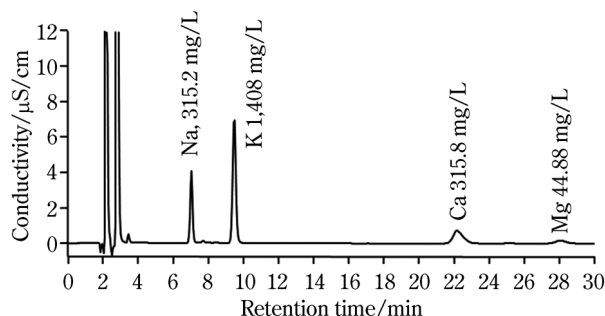


図 6 無乳糖ミルク中の陽イオンのクロマトグラム
カラム, Metrosep C 3-250/4.0 ; 溶離液, 1.7 mM HNO_3 /0.7 mM dipicolinic acid, 0.9 mL/min ; 温度, 30 °C ; 注入量, 20 μL .

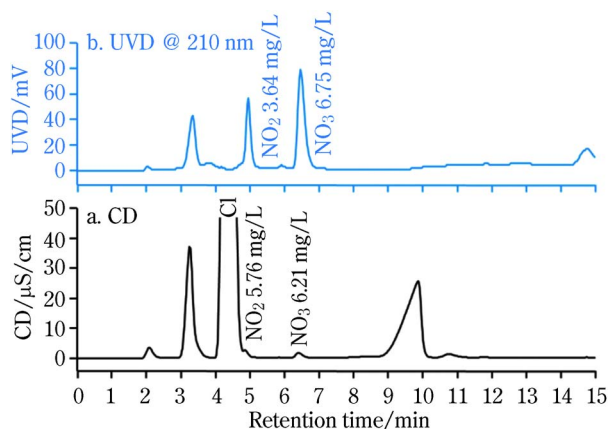


図 7 チーズ中の陰イオンのクロマトグラム
カラム, Metrosep A Supp 4-250/4.0 ; 溶離液, 1.8 mM Na_2CO_3 /1.7 mM NaHCO_3 , 1.2 mL/min ; 温度, 30 °C ; 注入量, 20 μL .

時間は 10 min とした。電気伝導度検出では塩化物イオンの大きなピークが検出され亜硝酸イオンの定量の妨害となったが、UVD を併用することで塩化物イオンの妨害を解消可能であった。

3.3 工業分野への展開

インラインダイアリシス-IC では、濃度差に基づく拡散透析を用いている。測定対象の無機イオンと夾雑成分との分離効率（透析効率）は拡散係数に依存する。一般に無機イオンの拡散係数は大きく、高分子化合物は小さいため分離・除去が可能である。つまり、拡散透析は拡散係数に大きな差がある成分の分離・除去に有効で、水への溶解度の低い有機化合物の分離・除去も可能である。また、粒子や繊維分等は、透析膜として用いている孔径 0.2 μm のメンブランフィルタを通過することができないためこれらの除去も可能である。透析法はこれらの特性を持っており、インラインダイアリシス-IC は食品分野だけでなく、工業製品・材料、工程水、廃水等のイオン分析にも適用可能である。

図 8 に、工業用塗料中の陰イオンのクロマトグラムを示す。黄色塗料を純水で 25 倍希釈し、インラインダイアリシス-IC で測定した。塗料中には多くの有機化合物が存在しているため、アセトン 10 % 添加した溶離液を用い、疎水性物質吸着用ガードカラム Metrosep RP2 Guard/3.5 を接続して測定した。塗料中からは、塩化物イオン、リン酸イオン及び硫酸イオンが検出されたが、これら以外にも多くのピークが検出された。

図 9 には、バイオディーゼル油中の陽イオンのクロマトグラムを示す。バイオディーゼル油は 2 mM HNO_3 と 1:1 で混合し、15 min 攪拌抽出後、静置して相分離させ、下層の水溶液を採取してインラインダイアリシス-IC で測定した。この場合も、溶離液にアセトン 10 % 添加して測定した。バイオディーゼル油からは、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが検出された。

透析法は無機イオン以外にも、拡散係数の高い有機酸やアミン、非イオン性化合物の測定に適用可能である。さらに、吸収液に有機溶媒を添加すれば有機化合物の抽出も可能である⁵⁾。

図 10 に、工場廃スラリー中の有機酸のクロマトグラムを示す。試料は純水で 100 倍希釈した後、イオン排除モードの有機酸分析用カラムを用いるインラインダイアリシス-IC で測定した。分離カラム保護のため、疎水性物質吸着用ガードカラム Metrosep RP2 Guard/3.5 を接続した。廃スラリー中からは、酢酸から吉草酸までの 6 種の有機酸が検出された。

4 おわりに

本稿では、透析法をインライン化したインラインダイ

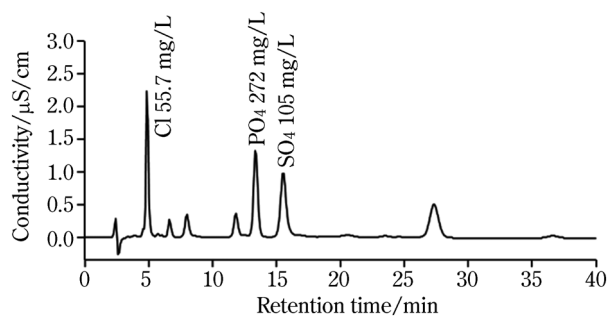


図 8 塗料中の陰イオンのクロマトグラム

カラム, Metrosep A Supp 5-150/4.0; 溶離液, 3.2 mM Na_2CO_3 / 1.0 mM NaHCO_3 + 10 % acetone, 0.7 mL/min; 温度, RT; 注入量, 20 μL .

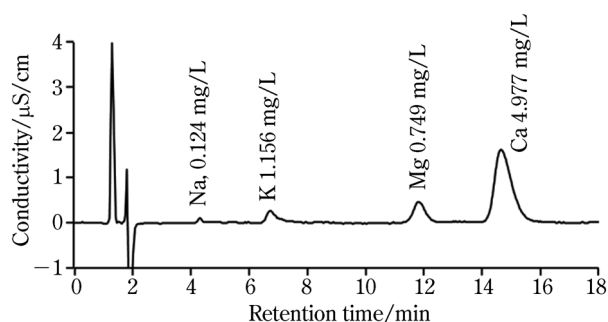


図 9 バイオディーゼル油中の陽イオンのクロマトグラム

カラム, Metrosep C 4-250/4.0; 溶離液, 2 mM HNO_3 + 10 % acetone, 1.0 mL/min; カラム温度, RT; 注入量, 20 μL .

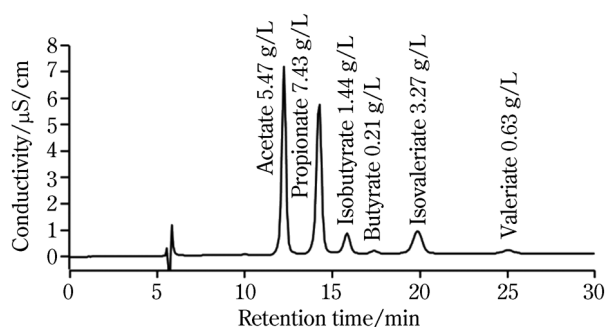


図 10 工場廃スラリー中の有機酸のクロマトグラム

カラム, Metrosep Organic Acids-250/7.8; 溶離液, 0.5 mM HClO_4 , 0.6 mL/min; 温度, 30 $^{\circ}\text{C}$; 注入量, 20 μL .

アリシス-IC による高濃度夾雑成分中無機イオンの定量について紹介した。本法を用いることで、有機夾雑成分、特に高分子夾雑成分による妨害を受けることなく微量イオンを再現性良く定量可能となる。インラインダイアリシス-IC は、食品の他、工業製品、排液・廃水等の中の無機イオンの定量に有用であり、種々の分野で利用されることを期待する。

文 献

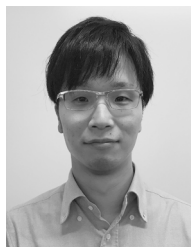
- 1) 岡田哲男, 山本 敦, 井上嘉則: “クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析, 改訂版”, (2010). (エヌティーエス).
- 2) Metrohm Brochure 8.940.5002EN: “Metrohm Inline Sample Preparation”.
- 3) 鈴木清一, 山本喬久, 小林泰之, 井上嘉則: 分析化学, **68**, 163 (2019).
- 4) 中島康夫, 鈴木清一, 山崎真樹子, 井上嘉則, 深津佑太, 山本 敦: 分析化学, **59**, 679 (2010).
- 5) Y. Nakashima, S. Suzuki, M. Yamazaki, Y. Inoue, Y. Fukatsu, A. Yamamoto: *Anal. Sci.*, **27**, 889 (2011).



小林泰之 (Yasuyuki KOBAYASHI)

メトロームジャパン株式会社 (〒143-0006 東京都大田区平和島 6-1-1 東京流通センター アネックス 9F)。中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻。修士。
《趣味》料理, 旅行。

E-mail: yasuyuki.kobayashi@metrohm.jp



山本喬久 (Takahisa YAMAMOTO)

メトロームジャパン株式会社 (〒143-0006 東京都大田区平和島 6-1-1 東京流通センター アネックス 9F)。中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻。修士。
《現在の研究テーマ》インライン前処理-ICシステムの構築及びその応用に関する研究。《趣味》カメラ, 読書, 愛犬との散歩。

E-mail: takahisa.yamamoto@metrohm.jp

メトロームジャパン株式会社ホームページ:

<https://www.metrohm.com/ja-jp>

メトロームジャパン株式会社イオンクロマトグラフページ:

https://www.metrohm.com/ja-jp/products-overview/ion_chromatography/

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象: 以下のような分析機器, 分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術, 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術, 3) 分析機器および分析手法の応用例, 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説, 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項, 6) その他, 分析機器の性能を十分に引き出すために有用な

情報など

新規性: 本記事の内容に関しては, 新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく, 既存の装置や技術に関わるもので構いません。また, 社会的要求が高いテーマや関連技術については, データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先:

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail: bunseki@jsac.or.jp]