

ガスクロマトグラフィーによる水中の 遊離低級脂肪酸の直接分析

— ギ酸の吸着抑制効果および分析条件の基礎的検討 —

荒又健夫*, 長坂實上**, 佐藤義典**

(平成元年 8 月 24 日受理)

Gas Chromatographic Determination of Lower Free Fatty Acids in Water by Direct Injection Method

— Effect of Formic Acid as an Adsorption Inhibitor and Regulation of Analytical Conditions —

Takeo ARAMATA*, Minoru NAGASAKA**, Yoshinori SATO**

Abstract—For establishing simple and rapid determination of lower fatty acids ($C_2 \sim C_5$) in sewage sludge, gas chromatography of free fatty acids in water was studied by use of direct injection method. This method has an interference problem of ghost peaks caused by irreversible adsorption of a free fatty acid mainly on the wall of evaporating port of gas chromatograph. Formic acid was used as an adsorption inhibitor to prevent from ghosting, because free fatty acids adsorbed were eluted by injecting formic acid.

Sample solutions for injection were prepared by adding 5 ml of the original samples to 5 ml of 1 v/v% formic acid. Five μ l of each sample solution was injected with a 10- μ l microsyringe.

The proposed method is simple and rapid, and yields good results with negligibly small interference of ghosting for a practical use. A linear calibration curves was obtained in the wide range of the concentration up to 10,000 mg/l for each fatty acid. Relative standard deviation of found values of the concentration was less than 4.6% for all fatty acids used. The detection limits were 2.5 mg/l for acetic acid, and 1 mg/l for other acids.

1. 緒 言

下水汚泥の腐敗過程の中間生成物として生成する低級脂肪酸 ($C_2 \sim C_5$) は、嫌気的環境条件や有機物質の分解機構と密接に関連しており¹⁾、消化槽や濃縮槽を維持管理するうえでの指標としても用いられる²⁾。また、

低級脂肪酸は活性汚泥に糸状性微生物を増殖させて、汚泥膨化(バルキング)を発生させる原因物質のひとつに考えられており³⁾、数mg/lの低濃度から数千mg/lの広い濃度範囲にわたる汚泥中の低級脂肪酸を分析する意義はますます大きくなってきている。

低級脂肪酸を迅速に分析するために、ガスクロマト

* 茨城大学工業短期大学部工業化学科(日立市中成沢町)

Department of Industrial Chemistry, College of Technology, Ibaraki University, Hitachi 316, Japan

** 茨城大学工学部工業化学科(日立市中成沢町)

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Ibaraki University, Hitachi 316, Japan

グラフィによる遊離低級脂肪酸の直接分析が行われている。しかし、直接分析では低級脂肪酸が注入部の金属部、石英ガラスウール、およびこれらに付着した不揮発性残留物に吸着されてテーリングピーク、ダブルピーク、ゴーストピークなどの異常ピークを生じることが知られている^{4)~7)}。ゴーストピークを抑制するために、Eenaeme ら⁸⁾は試料に高濃度のギ酸(15%)を添加して良好な結果を得ており、Geddes らはキャリアガスにギ酸蒸気を混入することを推奨している⁶⁾⁷⁾。

最近では水中の遊離低級脂肪酸分析用の充てん剤が開発され、またガラスカラムを用い、ギ酸を併用することなく分析が行われている。しかしガラスカラムでも吸着現象が見られ、特に微量分析では細心の注意を払う必要があることから⁹⁾、遊離低級脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる分析は現在でもなお困難な分野に属していると言える。ことに汚泥の分析においては注入部の汚れは避けられず、遊離低級脂肪酸の吸着を抑制するためにギ酸の使用が必要であると考えられる。しかし試薬ギ酸中には酢酸が不純物として含まれているため¹⁰⁾、前述のEenaeme らの方法では数mg/1程度の低濃度の酢酸の定量は困難であると考えられる。

そこで著者らは、下水汚泥中の低級脂肪酸を簡便迅速に定量することを目的として、水中の低級脂肪酸の直接分析におけるギ酸添加の効果および分析条件の基礎的検討を行った。

2. 実 験

2.1 試薬

低級脂肪酸は、ギ酸(純度90%)、酢酸(純度99.5%以上)、プロピオン酸(99.0%)、iso-酪酸(98.0%)、n-酪酸(98.0%)、iso-吉草酸(98.0%)およびn-吉草酸(98.0%)の試薬特級をそのまま使用した。

低級脂肪酸標準溶液は、上記の各脂肪酸をそれぞれ水に溶解して10,000mg/1の濃度の原液を調製し、適宜希釈混合して混合酸標準溶液として用いた。その他、本研究での試薬はすべて和光純薬工業製の特級品を用いた。

2.2 カラム充てん剤

カラム充てん剤としては、ガスクロ工業製のEGA 10% Uniport S 60/80、グラフィイトカーボン系の

Unicarbon A-300 60/80、ポラスポリマー系のGaskuropack 54 80/100およびUnisole F-200 30/60(固定相液体:エチレングリコール系,担体:Flusin P)を用いた。またギ酸中の酢酸の分析にはPEG 6000 10% Flusin P 30/60を用いた。

2.3 装置

ガスクロマトグラフは、気化室の汚れを容易に取り除くことができるガラスインサート式注入口を備えた日立製163型を使用し、検出器にはFIDを用いた。クロマトグラム上のピークの同定およびピーク面積の測定は島津製データ処理装置C-R2AX型で行った。

3. 結果および考察

3.1 吸着抑制に及ぼすギ酸の効果

3.1.1 ゴースト現象

Smith らはプロピオン酸とn-酪酸を用い、気化室を272°Cに加熱しながら酸素を通じて空焼きすることでゴーストピークの出現を防ぎ、気化室の汚れが遊離低級脂肪酸の吸着の主な原因であるとしている⁴⁾。Smith らの結果を確認するため、Gaskuropack 54 を充てんしたステンレスカラムを用いて、空焼き前および空焼き後の注入部に酢酸、プロピオン酸およびギ酸を連続して注入し、溶出した各低級脂肪酸のピークについて相対ピーク面積を測定した。その結果をFig. 1-1およびFig. 1-2に示す。注入部の空焼きはカラムを取り外した注入部を250°Cに加熱し、空気を約3時間通じて行った。空焼き前(Fig. 1-1)は、酢酸を注入した後のプロピオン酸の注入によって酢酸がゴーストピークとして溶出し、またそれに続くギ酸の注入では、プロピオン酸で洗い出し切れなかった酢酸がゴーストピークとして出現した。このことはギ酸が酢酸やプロピオン酸に比べて洗い出し効果の強いことを示している。一方、空焼き後(Fig. 1-2)は同様の操作によりそれぞれ極めて小さいゴーストピークが出現した。

以上の結果より、低級脂肪酸の吸着する箇所は主に注入部であり、また空焼きによって吸着を抑えられることが確認できた。しかし、Smith ら⁴⁾も指摘しているように、試料の注入を続けると再びゴーストピークが現れるようになることから、注入部を空焼きする方法は実用性に乏しい方法である。

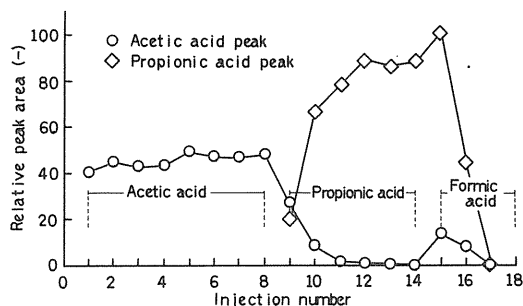


Fig. 1-1 Relation between injection number and peak area before air purging of injection port
Injection number : acetic acid (1-8); propionic acid (9-14); formic acid (15-18);
Sample : 1w/v% solution of each acid;
Packings : Gaskuropack 54; Column temperature : 200°C ; Sample volume : 5 μ l

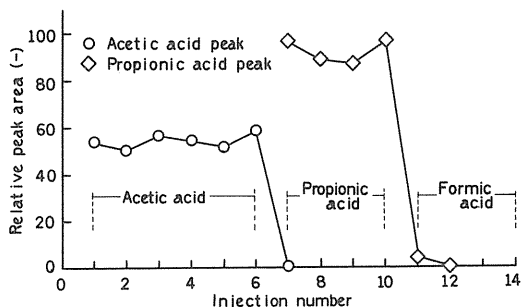


Fig. 1-2 Relation between injection number and peak area after air purging of injection port
Injection number : acetic acid (1-6); propionic acid (7-10); formic acid (11-14);
Sample : 0.1w/v% solution of each acid;
Packings : Gaskuropack 54; Column temperature : 200°C ; Sample volume : 5 μ l

ガラスカラムを用いてオンカラム方式の注入を試みたが、ステンレスカラムに比べてクロマトグラムに現れたゴーストピークは小さかったものの、ゴーストピークの出現を完全に抑えることはできなかった。

これらのことから、気化室の不揮発性残留物を容易に取り除くことができるガラスインサート式注入口を用い、カラムには取り扱いが容易なステンレスカラムを用いることとした。また、分析の対象である遊離低級脂肪酸の吸着を抑制するためにギ酸を用いることにした。

3.1.2 吸着抑制効果に及ぶギ酸濃度の影響

酢酸, プロピオン酸, n-酪酸, n-吉草酸の混合酸標準

溶液を用いてギ酸の効果について調べた。添加したギ酸の濃度と吸着されずに溶出する各低級脂肪酸の溶出率(Elution ratio)の関係を Fig. 2 に示す。なお溶出率は式(1)により求めた。

$$\text{溶出率 (\%)} = \frac{S}{S+W} \times 100 \quad (1)$$

ここで

S : 試料液の注入で溶出したピーク面積

W : ギ酸(1v/v%)で洗い出されたピーク面積

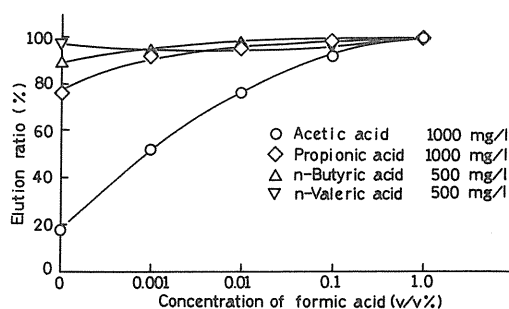


Fig. 2 Effect of the concentration of formic acid added on elution ratio of acetic acid, propionic acid, n-butyric acid and n-valeric acid
Packings : EGA 10% Uniport S ; Column temperature: 100°C ; Sample volume: 5 μ l

試料にギ酸を添加していないときの溶出率は、酢酸が17.6%, プロピオン酸が76.4%, n-酪酸が89.4%, n-吉草酸が96.9%であったが、ギ酸の添加で溶出率が向上し、ギ酸濃度 1v/v% でほぼ100%に達した。これらの低級脂肪酸のなかで酢酸が最も強く吸着され、分子量が大きくなるに従って脂肪酸は次第に吸着されなくなる傾向が見られた。

前述したように、添加したギ酸が高濃度であるほど吸着を抑制する効果は強くなる。しかし、試薬ギ酸には酢酸(max. 0.05%, Merck 社規格¹⁰⁾)が不純物として含まれているため、ギ酸を高濃度に添加することは低濃度の酢酸の定量を困難にする。また試薬ギ酸中の酢酸含有量が多ければ、同様に低濃度の酢酸の定量が困難になる。そこで、ギ酸と酢酸を分離できる充てん剤 PEG 6000 10% Flusin P を用い、試薬ギ酸1 μ l を注入して、本研究で使用した試薬ギ酸中の酢酸の定量を試みた。分析結果を Table 1 に示す。その結果、試薬ギ酸(純度90%)には約1,140mg/l, また試薬ギ酸(純度99%)には約670mg/lの酢酸が含まれていた。また一般

Table 1 Analytical values of acetic acid as an impurity in formic acid reagent, and response intensity of FID for formic acid

Sample	Concentration (as acetic acid mg/l)		
	Acetic acid	Formic acid ^a	Acetic + Formic acid
Formic acid reagent			
ca. 90% pure	1140	430	1570 ^b
1v/v% aq. soln.	11.4 ^b	4.3 ^b	15.7 ^b (16.4) ^c
Formic acid reagent			
ca. 99% pure	670	430	1100 ^b
1v/v% aq. soln.	6.7 ^b	4.3 ^b	11.0 ^b

Packings: PEG 6000 10% Flusin P; Column: stainless steel. 3mm i.d. X 1m

^a Response intensity of FID as acetic acid, ^b Calculated values,

^c Measured values

に FID はギ酸に応答しないと言われているが⁷⁾, ギ酸自身も酢酸換算で約430mg/lに相当した応答を示すことが分った。

低級脂肪酸の分析に用いた充てん剤 Unisole F-200 は, 酢酸とギ酸のピークが重なるため, 試薬ギ酸(純度90%)を用いてギ酸(1v/v%)を調製した場合, 酢酸 11.4mg/lにFIDへのギ酸の応答強度(酢酸換算4.3mg/l)が加算され, 計算上は酢酸15.7mg/lに相当した応答を示すことになる。これは実測値の16.4mg/lとよく一致していた。また試薬ギ酸(純度99%)を用いてギ酸(1v/v%)を調製した場合でも, 計算上は酢酸として11.0mg/lの応答を示し, 試薬(純度90%)を用いた場合と比べて大きな違いが見られなかった。

以上のことから, 本研究では純度90%の試薬ギ酸を用い, また添加するギ酸の濃度を1v/v%とした。

3.1.3 酢酸塩に対するギ酸の効果

汚泥にはアンモニウムイオンや他の陽イオンが共存しており, 低級脂肪酸は遊離の状態のみで存在していない。低級脂肪酸のなかで最も強く吸着された酢酸を用いて, 塩類に対するギ酸の効果を調べた。充てん剤に EGA 10% Uniport S を用い, 酢酸, 酢酸アンモニウムおよび酢酸ナトリウムの水溶液にギ酸を添加した試料液で得られた, 酢酸および酢酸塩の濃度(酢酸換算)とピーク面積の関係を Fig. 3 に示す。酢酸, 酢酸ナトリウムおよび酢酸アンモニウムはほぼ同じ直線上に

あり, ギ酸は低級脂肪酸の塩類に対しても吸着を抑制する効果のあることが確かめられた。

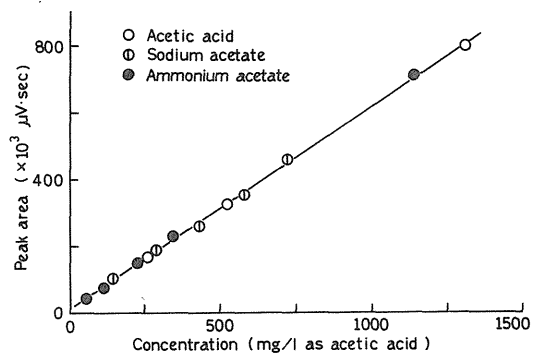


Fig. 3 Effect of addition of formic acid on the calibration curves for acetic acid, sodium acetate and ammonium acetate

Added amount of formic acid (1v/v%): equal volum to the sample; Packings: EGA Uniport S; Column temperature: 100°C; Sample volume: 5μl

3.2 ガスクロマトグラフの分析条件の検討

3.2.1 充てん剤の選定

カラム充てん剤を選定するために (a) Gaskuropack 54, (b) Uicarbon A-300, (c) EGA 10% Uniport S および (d) Unisole F-200 の4種類の充てん剤を用いて

比較検討した。Muller¹¹⁾によれば汚泥中の低級脂肪酸は、酢酸47.3~68.9%, プロピオン酸23.0~32.5%, また酪酸4.4~19.7%であり, 主な成分は酢酸とプロピオン酸である。できるだけ実試料に近い組成で充てん剤の性能を比較するために, 酢酸1000mg/l, プロピオン酸500mg/l, iso-酪酸100mg/l, n-酪酸200mg/l, iso-吉草酸100mg/lおよびn-吉草酸100mg/lの混合酸標準試料で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4-(a)~(d)に示す。

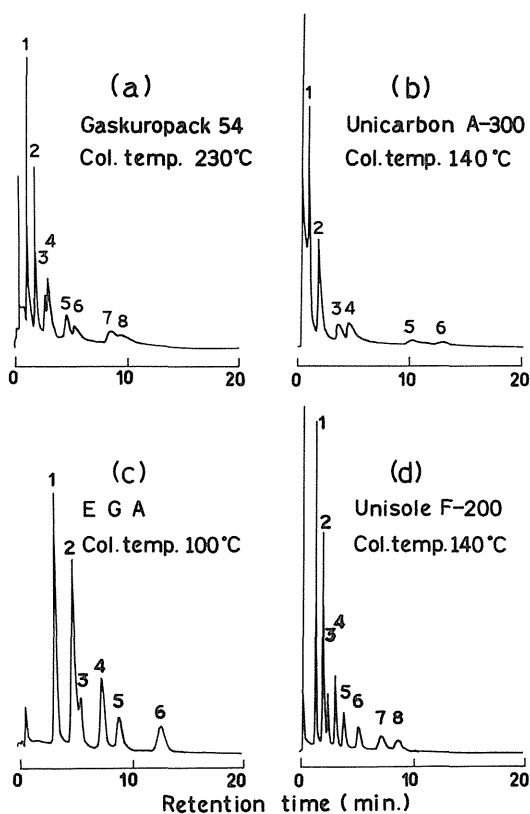


Fig. 4 Typical chromatograms obtained with (a) Gaskuropack 54, (b) Unicarbon A-300, (c) EGA 10% Uniport S and (d) Unisole F-200
 Peaks : 1=acetic acid (1000 mg/l), 2=propionic acid (500 mg/l), 3=iso-butyric acid (100 mg/l), 4=n-butyric acid (200 mg/l), 5=iso-valeric acid (100 mg/l), 6=n-valeric acid (100 mg/l), 7=iso-caproic acid (100 mg/l), 8=n-caproic acid (100 mg/l)

これら4種の充てん剤のなかで, (c)と(d)を用いた場合にプロピオン酸と iso-酪酸のピークは完全に分離されなかった。これら2つの酸のピークの分離率¹²⁾を Table2 に示す。(d)を用いたときのプロピオン酸と iso-酪酸の分離率は, カラム温度120°Cで95.8%, 140°Cで91.5%であり, カラム温度140°Cでの両ピークの分離は120°Cより劣るが, それぞれ定量が可能であった。また他の3種の充てん剤に比べてシャープなピークが得られるため, 酢酸から n-吉草酸までを約7分以内で分析することができた。以上の結果より, 本法に最適な充てん剤として(d)を選んだ。

Table 2 Resolution of Propionic and iso-Butyric acid peak

Column packings	Column temp. (°C)	Resolution (%)
EGA 10% Uniport S	100	76.5
Unisole F-200	120	95.8
	140	91.5

3.2.2 ピークの鋭さおよび再現性

(1) 気化室温度の影響

酢酸1000mg/lを5 μ l注入したときの気化室温度とピーク高さ, ピーク面積, および相対標準偏差の関係を Fig. 5 に示す。気化室温度が高いほどシャープなピークが得られ, また測定されたピークの高さの再現性も向上したが, その相対標準偏差は6.0~8.6%であって実用上不十分であった。一方, ピーク面積は気

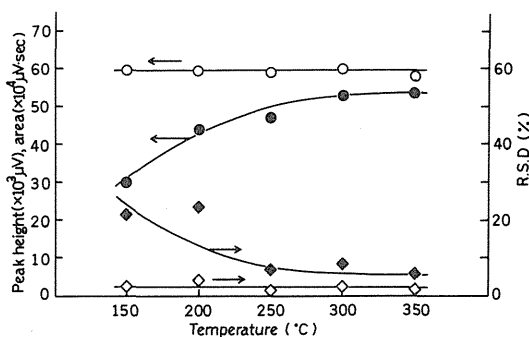


Fig. 5 Effect of injection port temperature on peak height, peak area and their relative standard deviation (R. S. D)
 ○ : area; ● : height; ◇ : R. S. D (area); ◆ : R. S. D (height)
 Sample : acetic acid (1000 mg/l); Results of 8 replicates
 Packings : Unisole F-200; Sample volume : 5 μ l

化室温度やピーク形状に影響されずほぼ一定しており、また相対標準偏差は1.6~4.2%であって、ピーク高さに比較して良好な再現性を示した。

(2) 注入量の影響

注入量を変えたときのピーク高さ、ピーク面積およびそれぞれの相対標準偏差を Fig. 6 に示す。ピーク高さは注入量と直線関係を示さず、また各注入量について測定されるピーク高さの再現性は注入量の増加に伴って悪くなった。一方、ピーク面積は注入量に比例した直線関係を示し、また各注入量におけるピーク面積の相対標準偏差は1.0~1.8%であり再現性は良好であった。

以上の結果より、再現性あるシブなピークを得るためには少量の試料液を注入し、気化室の温度を高くすることが望ましい。しかし、注入量0.5 μ lのときの酢酸の溶出率は90.4%であり、添加したギ酸が吸着を抑える効果は減少した。この溶出率は0.1v/v%ギ酸を添加した試料液を5 μ l注入したとき得られた92.2% (Fig. 2 参照) にほぼ一致していた。これは注入された酸の量が少なくなったため、吸着を抑制する効果が弱まったものと思われる。

従って、ギ酸量および注入口のセパタムの耐熱性を考慮して、注入量を5 μ l とし、気化室温度を200~220 $^{\circ}$ C とした。なお、注入量5 μ l でのピーク高さの変動が大きいため、定量に際してはピーク面積を用いた。

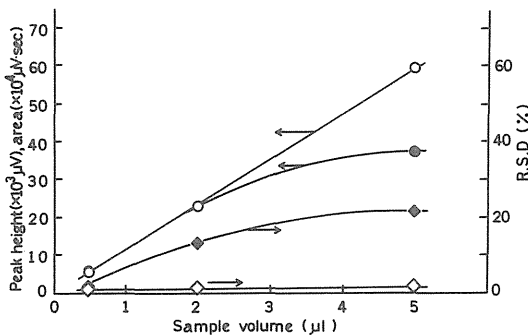


Fig. 6 Effect of sample volume on peak height, peak area and their relative standard deviation (R. S. D)
 ○ : area; ● : height; ◇ : R. S. D (area);
 ◆ : R. S. D (height)
 Sample : acetic acid (1000 mg/l); Results of 5 replicates
 Packings : Unisole F-200; Injection temperature : 200 $^{\circ}$ C

3.2.3 キャリヤーガス流量とカラム効率

キャリヤーガスにヘリウムを用いたときの、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸およびn-吉草酸のキャリヤーガス流量とカラム効率の関係を Fig. 7 に示す。キャリヤーガス流量40~50ml/min で最適のカラム効率を得られた。

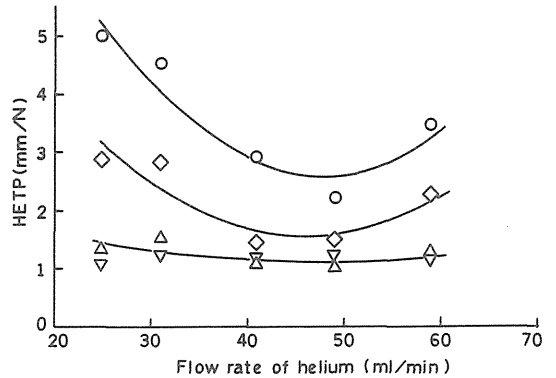


Fig. 7 Height equivalent to a theoretical plate (HETP) versus flow rate of helium
 ○ : acetic acid (1000 mg/l); ◇ : propionic acid (500 mg/l); △ : n-butyrac acid (200 mg/l);
 ▽ : n-valeric acid (100 mg/l)
 Packings : Unisole F-200; Column temperature : 130 $^{\circ}$ C; Sample volume : 5 μ l

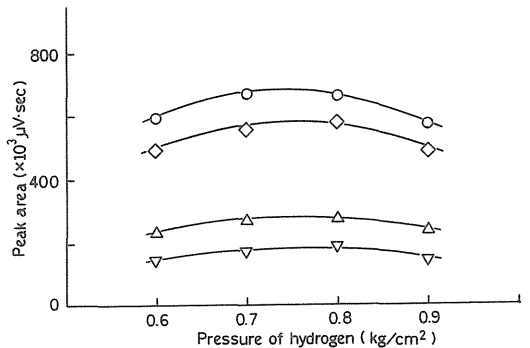


Fig. 8 Response intensity of flame ionization detector versus pressure of hydrogen
 ○ : acetic acid (1000 mg/l); ◇ : propionic acid (500 mg/l); △ : n-butyrac acid (200 mg/l);
 ▽ : n-valeric acid (100 mg/l)
 Packings : EGA 10% Uniport S; Flow rate : helium 50 ml/min; Air : 2.0 Kg/cm 2

3.2.4 水素流量とFID感度の関係

水素圧とFID感度の関係をFig. 8に示す。ヘリウム流量50ml/min, 空気圧2 kg/cm²のときに水素圧0.7~0.8kg/cm²で最大の感度を示した。しかし試料の注入でFIDのフレームが消えることがあったので, 感度は低下するが安全をみて水素圧を0.9kg/cm²とした。

3.3 検量線

低濃度領域(0~約100mg/l)で作成した検量線をFig. 9-1に, また高濃度領域(0~約10,000mg/l)で作成した検量線をFig. 9-2に示す。プロピオン酸, iso-酪酸, n-酪酸, iso-吉草酸およびn-吉草酸の検量線はそれぞれ約10,000mg/lまで原点を通る良好な直線関係にあった。なお前述(3.1.2)したように, 添加したギ酸に酢酸が含まれていることから, 酢酸の検量線は原点を通らなかったが約10,000mg/lまで良好な直線関係を示した。

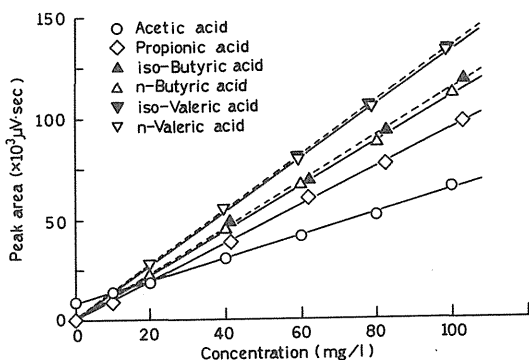


Fig. 9-1 Calibration curves in a low concentration range

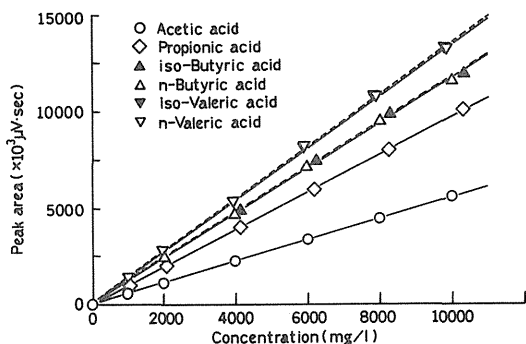


Fig. 9-2 Calibration curves in a high concentration range

3.4 分析の基本操作

以上のことから, 分析の基本操作として次の簡便な方法を採用し, またガスクロマトグラフィーによる測定はTable 3に示す条件に設定した。

(1) ガスクロ用試料液の調整

試料溶液5 ml にギ酸(1v/v%) 5 ml を添加し, ガスクロ分析用の試料液とする。

(2) 分析操作

ギ酸(1v/v%)数μlを連続して数回注入し, ゴーストピークが溶出しないことを確かめる。ガスクロ用試料液5μlを注入して, 得られたクロマトグラムについてピーク面積を測定する。混合酸標準試料液とギ酸(1v/v%)のブランク試料液を用いて, あらかじめ作成してある検量線(2点検量線法)から低級脂肪酸を定量する。次いで, 再びギ酸(1v/v%)数μlを連続して数回注入し, 吸着した低級脂肪酸を洗い出し, 次の試料液の分析に備える。

Table 3 Analytical conditions of gas chromatography

Gas chromatograph	Model 163, Hitachi, Ltd.
Injector	with glass insert
Injection port temperature	200~220 °C
Detector	FID
Hydrogen pressure	0.9 Kg/cm ²
Air pressure	2.0 Kg/cm ²
Column	Stainless, 2 m × 3 mm i.d.
Packings	Unisole F-200 30/60 Gaskuro kogyo Inc.
Column temperature	140 °C
Carrier gas	Helium
Flow rate	50 ml/min.
Sample volume	5 μl

3.5 分析の精度および検出限界

混合酸標準試料を繰り返し注入し, 得られたクロマトグラムより各成分量を求め, その再現性を調べた。ステンレスカラムおよびオンカラム注入方式のガラスカラムで得られた結果をTable 4に示す。

各低級脂肪酸の種類と濃度により異なるが, ステンレスカラムを用いて測定した各低級脂肪酸の分析値の相対標準偏差はいずれも5%以下で, ガラスカラムを用いた場合のものに比べて精度は少し悪いが, 実用上差し支えないと考えられる精度が得られた。検出限界¹³⁾は酢酸については約2.5mg/lであり, 他の低級脂肪酸については1 mg/l程度であった。また酢酸の保証限界¹³⁾は約5 mg/lであった。

Table 4 Comparison of precision of observed values of concentrations of lower fatty acids measured with a stainless steel column and a glass column

Column	Repetitions	Relative standard deviation (%)					
		Acetic	Propionic	iso-Butyric	n-Butyric	iso-Valeric	n-Valeric
Acid mixture sample A							
Composition(mg/l)		100	50	10	20	10	10
Stainless	8	2.6	1.9	3.1	4.4	5.0	4.6
Glass	8	1.2	1.4	5.5	3.5	2.5	5.9
Acid mixture sample B							
Composition(mg/l)		2500	1250	250	500	250	250
Stainless	6	1.6	1.7	3.5	2.8	3.1	1.7
Glass	6	0.8	1.1	5.9	1.3	1.5	0.9

4. 結 言

下水汚泥中の低級脂肪酸($C_2 \sim C_5$)の簡易定量を目的として、ガスクロマトグラフィーによる遊離低級脂肪酸の直接分析について基礎的検討を行った。

遊離低級脂肪酸の直接分析では、吸着に基づくゴーストピークが出現して分析を妨害するが、試料溶液に等容のギ酸(1v/v%)を添加することで、その妨害を実用上差し支えない程度まで小さくできた。ギ酸を添加して試料液とする本法は、それぞれの低級脂肪酸の検量線は低濃度から約10,000mg/lまで直線関係にあるため適用範囲が広く、充てん剤にUnisole F-200を用いてカラム温度140°Cのとき、酢酸(C_2)からn-吉草酸(C_5)までを約7分以内で迅速かつ精度よく分析できた。

また酢酸を用いた実験から、本法は遊離酸だけでなく、アンモニウム塩やナトリウム塩についても定量可能であったので、下水汚泥の分析に応用できると思われる。

(1983年, 日本下水道協会 第20回下水道研究発表会において一部発表)

参 考 文 献

- J. S. Jeris, P. L. McCarty: *Jour. WPCF*, **37**, p. 178-192(1965)
- 建設省都市下水道部・厚生省環境衛生局水道環境部監修: 「下水道維持管理指針(1979年版)」, p. 331-336, 日本下水道協会(1979)
- 日本下水道事業団業務部編: 「汚泥の膨化にともなう汚泥浮上の防止策に関する調査報告書」, 日本下水道事業団(昭和60年3月)
- E. D. Smith, A. B. Gonsnell: *Anal. Chem.*, **34**, p. 646-648(1962)
- D. M. Ottenstein, D. A. Bartley: *Anal. Chem.*, **43**, p. 952-955(1971)
- D.A.M. Geddes, M.N.Gilmour: *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, p. 394-397(1970)
- G. C. Cochrane: *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, p. 440-447(1975)
- C. C. Van Eenaeme, J. M. Bienfait, O. Lambot: *Ann. Med. Vet.*, **109**, p. 569-584(1965)
- ガスクロ工業総合カタログ, No. 22, p. 400(昭和63年11月)
- Merck 社試薬カタログ, p. 314(1973/74年版)
- L. E. Muller, E. Hindin, J. V. Lunsford, G. H. Dunstan: *Seawage and Industrial Wastes*, **31**, p. 669-677(1959)
- 波多野博行編: 「新高速液体クロマトグラフィー」, 化学の領域, 増刊121号, p. 2, 南江堂(1978)
- 河口広司: 「検出限界と感度」, ぶんせき, 1982年第1号, p. 36-42, 日本分析化学会(1982)