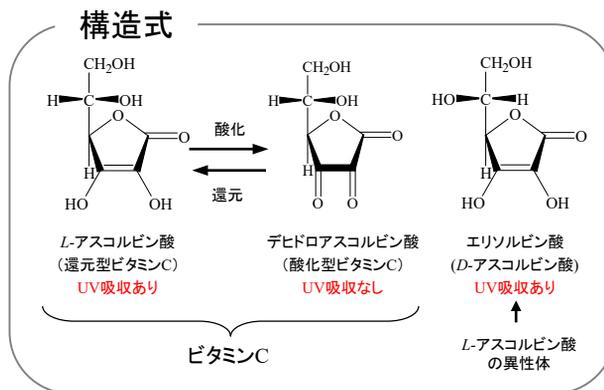


今回は、GL7700高速液体クロマトグラフィー(HPLC-PDA)シリーズを用いたビタミンCの分析をご紹介します。

ビタミンC活性を持つ物質として、アスコルビン酸(AsA)とデヒドロアスコルビン酸(DHAsA)があります。AsAにはUV吸収がありますが、DHAsAにはありません。そこで、UV吸収がある形に変化させ、総量を測定することになります。また、AsAの異性体として食品添加物であるエリソルビン酸(ErA)があります。

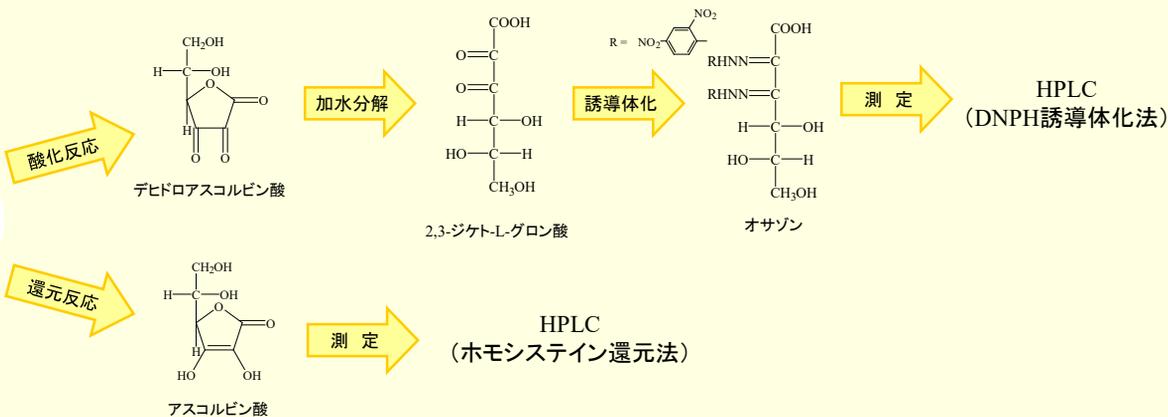
これらの分析を食品衛生検査指針に準拠した形で行いました。



概略

DNPH誘導体化法では、総アスコルビン酸の測定が可能です。一方、ホモシステイン還元法では、エリソルビン酸との同時分析、還元型アスコルビン酸のみの分析が可能です。

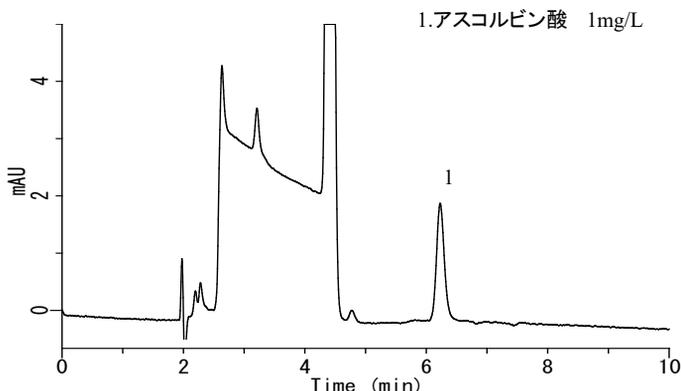
試料



標準液測定例

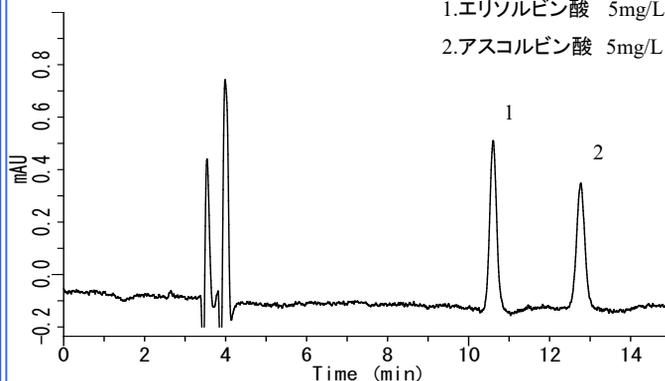
DNPH誘導体化法

食品衛生検査指針の食品成分および衛生試験法2005で採用されています。



ホモシステイン還元法

食品衛生検査指針の食品添加物試験で採用されています。



HPLC条件①

カラム : Inertsil SIL-100A (5μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
 溶離液 : A) CH₃COOC₂H₅
 B) n-Hexane
 C) CH₃COOH
 A/B/C = 50/40/10, v/v/v
 流量 : 1.5 mL/min
 カラム温度 : 40 °C
 検出 : PDA 495 nm
 注入量 : 20 μL

HPLC条件②

カラム : Inertsil NH₂ (5μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
 溶離液 : A) CH₃CN
 B) CH₃OH
 C) 0.01M りん酸二水素ナトリウム水溶液
 D) 0.03% ホモシステイン
 A/B/C/D = 600/30/100/30, v/v/v/v
 流量 : 1.0 mL/min
 カラム温度 : 40 °C
 検出 : PDA 270 nm
 注入量 : 5 μL

DNPH誘導体化法による測定

前処理例

試料

- 5g
- 5%メタリン酸 30mL
- 磨砕抽出
- 5%メタリン酸で50mLに定容

ろ過

- 遠心分離 3000rpm, 10min
- 0.45 μ mフィルター

分取

- 2mL分取

誘導体化

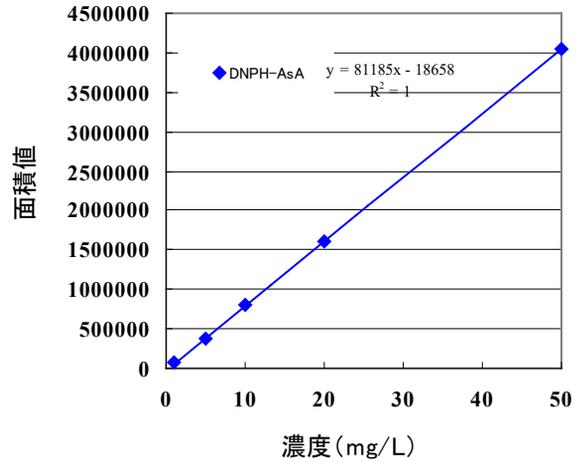
- 5%メタリン酸 1mL
- 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール 3滴程
- 2%チオ尿素・メタリン酸溶液 2mL
- 2% 2,4-DNPH・4.5M硫酸溶液 0.5mL
- 加熱 (50°C, 90min)
- 水冷

液液抽出

- 酢酸エチル 2mL
- 振とう 1hr

測定用試料

- 上層
- 0.5mL分取
- ヘキサンで1mLに定容
- 下層 廃棄

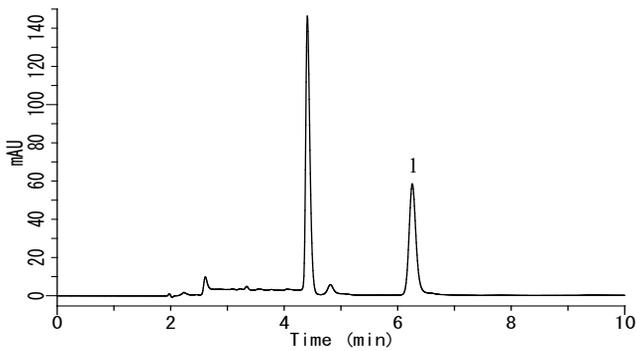


検量線※1

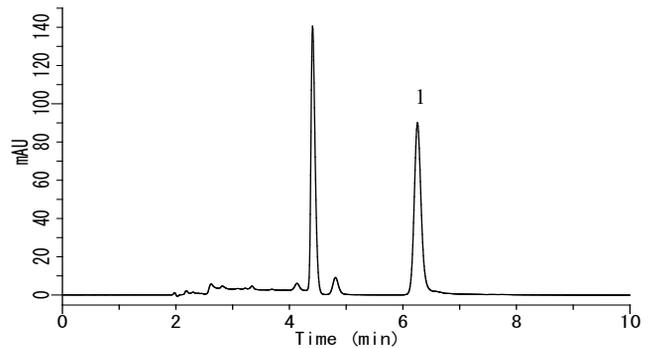
※1: アスコルビン酸を段階的に希釈し、それぞれ前処理したものを検量線用試料としました。
検量線に表示してある濃度は、希釈直後の濃度です。

測定例 (HPLC条件①)

お茶抽出液

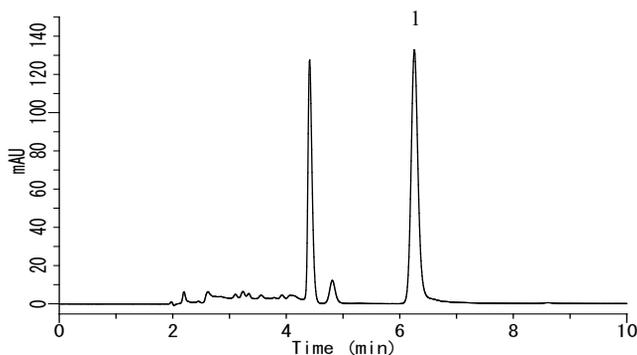


ウイナー抽出液

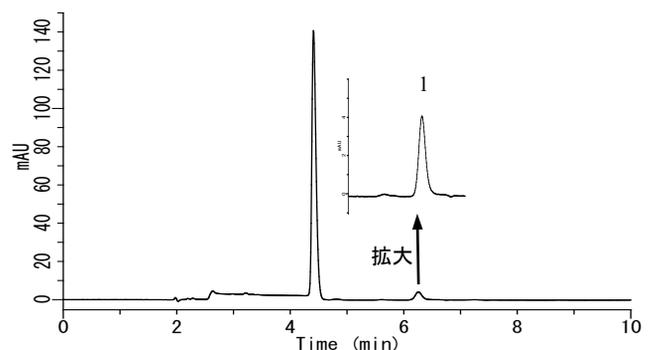


1.アスコルビン酸

粉ミルク抽出液

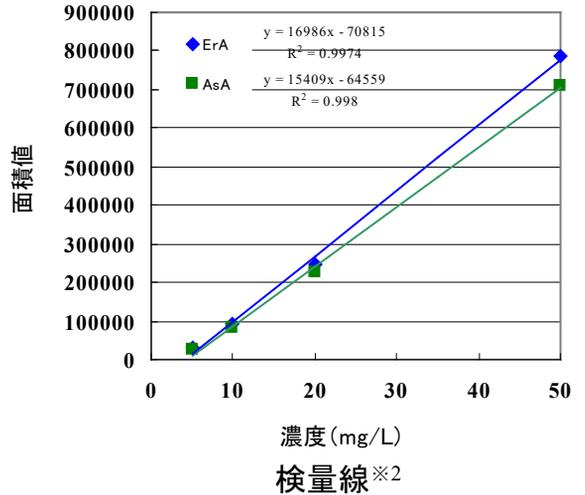
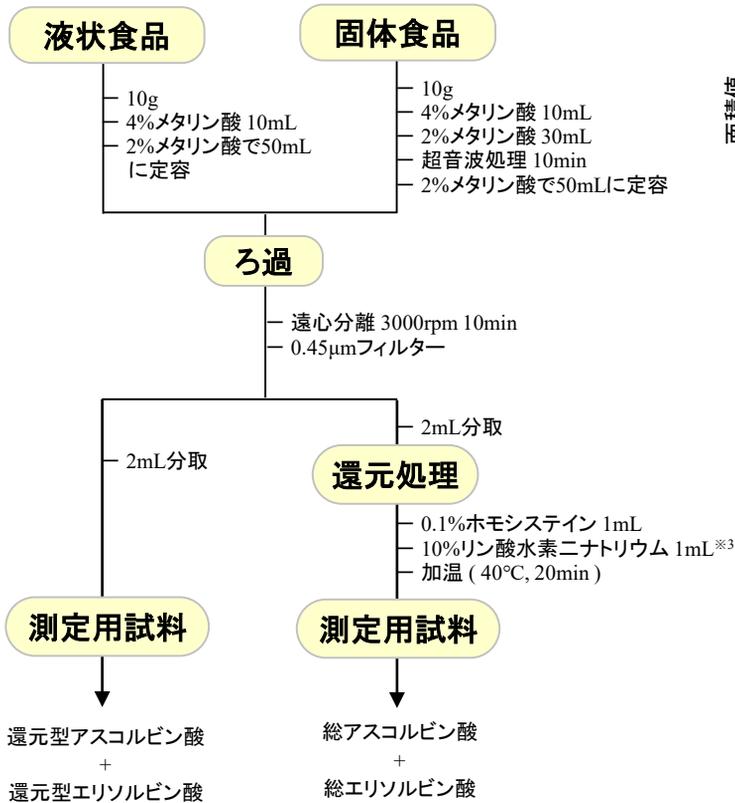


冷凍ほうれん草抽出液



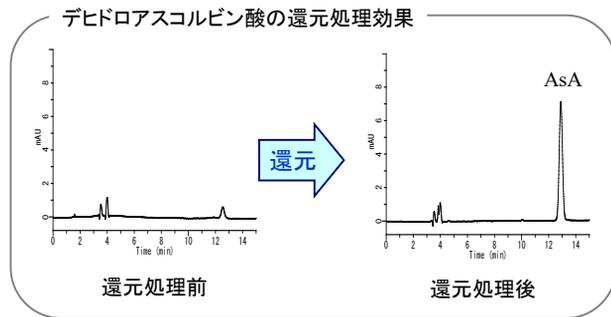
ホモシステイン還元法による測定

前処理例



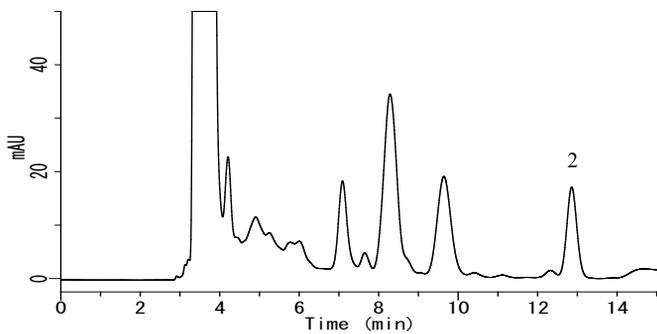
※2:アスコルビン酸とエリソルビン酸を2%メタリン酸溶液で希釈したものを検量線用試料としました。

※3:リン酸水素二ナトリウム・12水和物 1.0gを水10 mLに溶かしたものを。

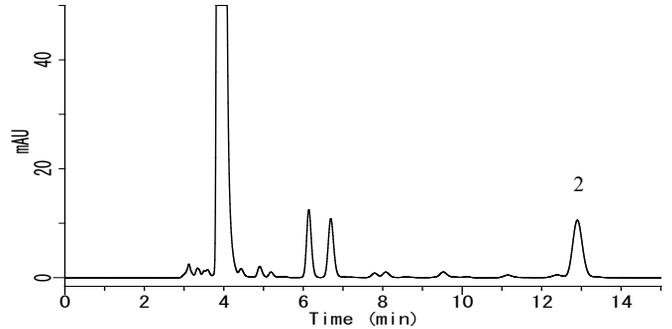


測定例 (HPLC条件②)

お茶抽出液

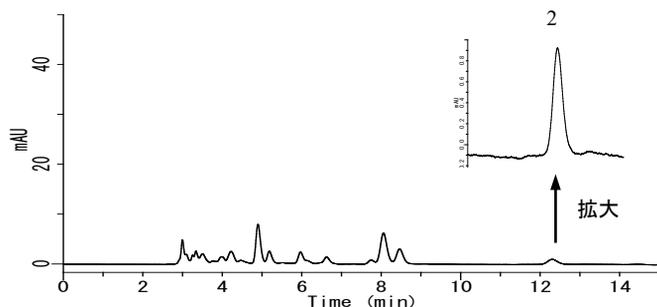


ウイナー抽出液

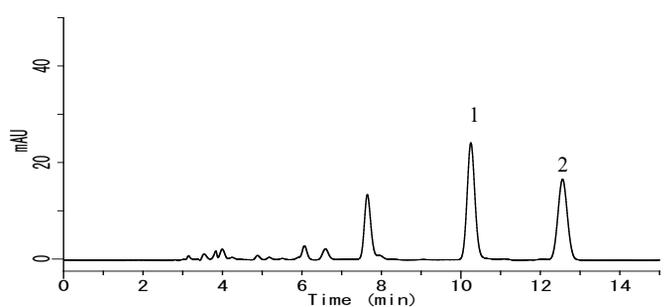


- 1.エリソルビン酸
- 2.アスコルビン酸

ビール抽出液

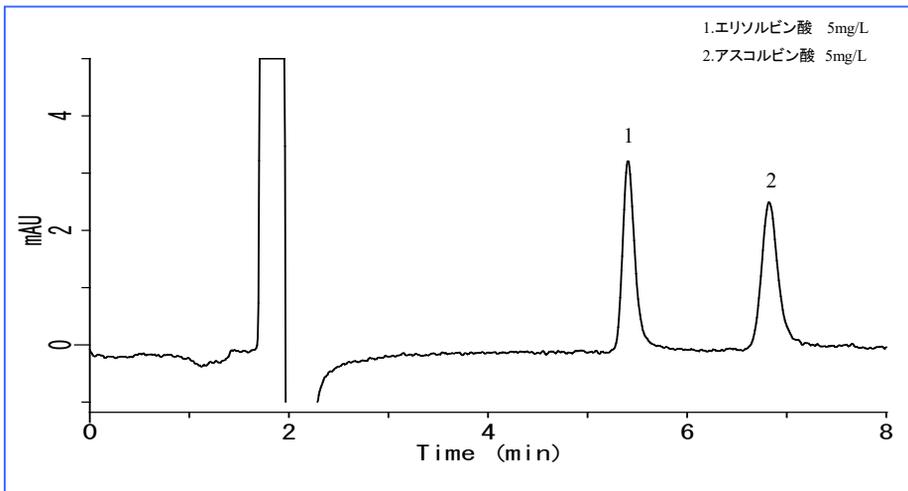


魚肉ソーセージ抽出液



ホモシステイン還元法での分析条件変更例

ホモシステイン還元法のHPLC分析条件は、つぎの条件も食品衛生検査指針に参考法として記載されています。



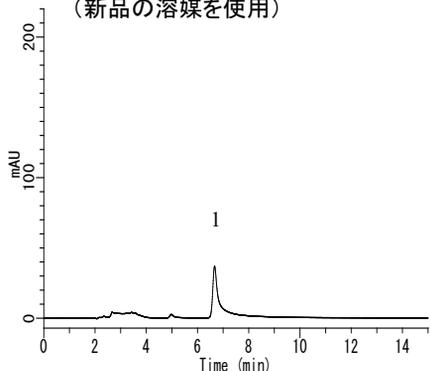
HPLC条件③

カラム : Inertsil NH₂
(5μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
溶離液 : A) CH₃CN
B) H₂O
C) CH₃COOH
A/B/C = 87/11/2, v/v/v
流量 : 2.0 mL/min
カラム温度 : 40 °C
検出 : PDA 243 nm
注入量 : 20 μL

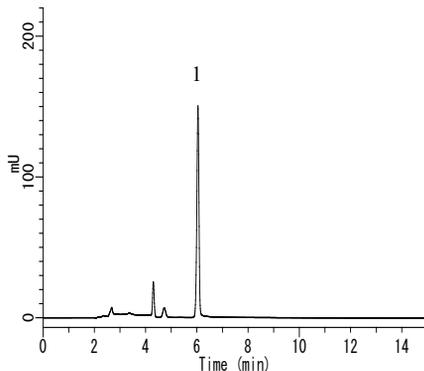
DNPH誘導体化法での分析条件変更例

本移動相条件のような順相分析では、移動相中の含水量の影響を受けやすく、試薬の純度や開封後の保管状態によって、同じカラムを使用してもピーク形状が崩れる場合があります。
この場合、酢酸エチルの割合を増やし、酢酸とヘキサンを割合を下げることで、ピーク形状の改善を行う方法もあります。

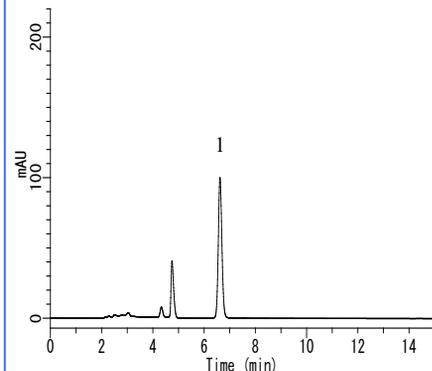
試験法記載の移動相
(新品の溶媒を使用)



超純水を移動相に添加



超純水を添加せずに、移動相の割合変更



HPLC条件①

カラム : Inertsil SIL-100A
(5μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
溶離液 : A) CH₃COOC₂H₅
B) n-Hexane
C) CH₃COOH
A/B/C = 50/40/10, v/v/v
(Premix)
流量 : 1.5 mL/min
カラム温度 : 40 °C
検出 : PDA 495 nm
注入量 : 20 μL

HPLC条件④

カラム : Inertsil SIL-100A
(5μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
溶離液 : A) CH₃COOC₂H₅
B) n-Hexane
C) CH₃COOH
D) H₂O
A/B/C/D = 50/40/10/0.2, v/v/v/v
(Premix)
流量 : 1.5 mL/min
カラム温度 : 40 °C
検出 : PDA 495 nm
注入量 : 20 μL

HPLC条件⑤

カラム : Inertsil SIL-100A
(5μm, 250 x 4.6 mm I.D.)
溶離液 : A) CH₃COOC₂H₅
B) n-Hexane
C) CH₃COOH
A/B/C = 69/30/1, v/v/v
(Premix)
流量 : 1.5 mL/min
カラム温度 : 40 °C
検出 : PDA 495 nm
注入量 : 20 μL



ジーエルサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお薦めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しましては、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行なっております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@glsc.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.glsc.co.jp/technique/app/app_search.html