

有機酸のHPLC分析には、陰イオン交換、イオン排除、逆相等の分離モードが利用されており、中でも最近是有機酸専用カラムを用いたイオン排除モードで分析された例が増えてきています。

しかし、イオン排除モードにて分離を向上させるためには、分析時間を長くする必要があります。

そこで今回、イオン交換カラムを用いた

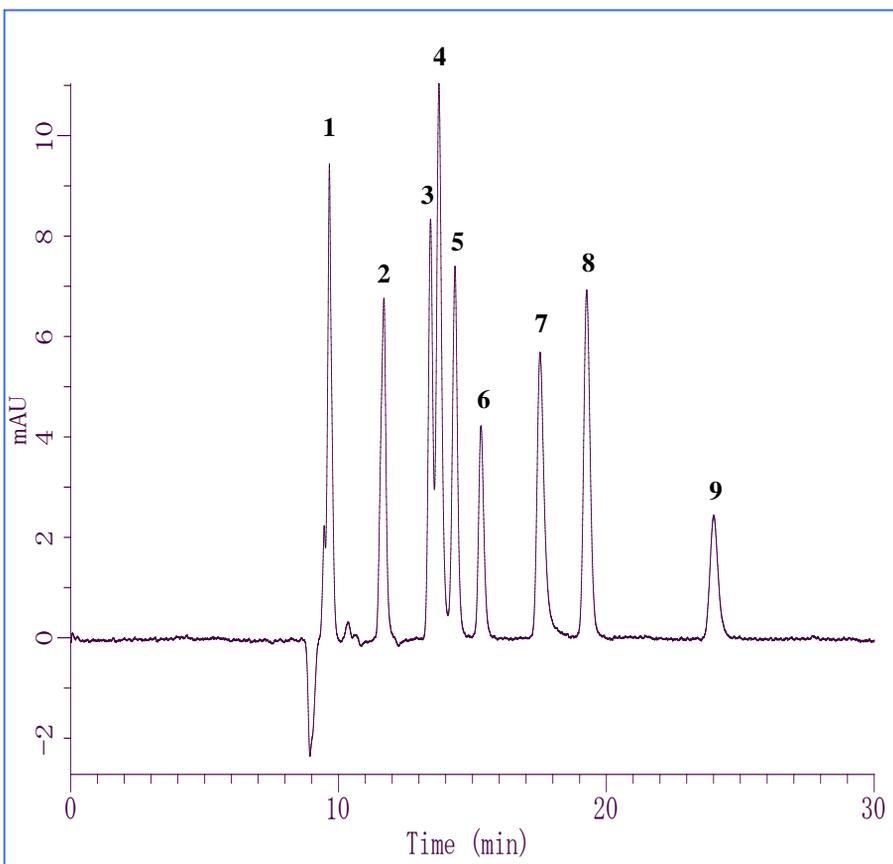
『**イオン排除モード**』と逆相系カラムを用いた『**疎水性相互作用モード**』を併用して分析しました。分離モードが異なる2種類の汎用サイズ(250x4.6mmI.D.)のカラムを用いることでリン酸と有機酸8成分の迅速一斉分析が可能となりましたのでご紹介します。

前報との比較(Technical Note No.1)

テクニカルノートNo.1のデータでは、クエン酸と酒石酸、乳酸とギ酸の分離が困難でしたが、今回はこの点を改善しました。

** 利点 **

1. イオン排除モードに逆相モードを組み合わせることで、**有機酸8成分を分離!**
2. BTB(プロモテモールブルー)試薬を使用したポストラベル法により**夾雑物の影響を排除!**
3. 汎用サイズ(4.6x250mmI.D.)のカラム2本で分離できるため、**安価で迅速に分析可能!**



* HPLC条件 *

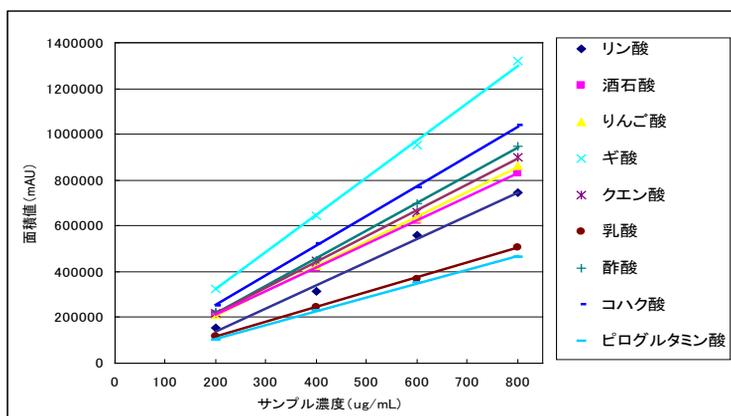
移動相 : 3mM HClO₄
 反応液 : 0.1mM BTB + 30mM Na₂HPO₄
 カラム : Inertsil Ph-3 (250 × 4.6 mmI.D.)
 + Inertsil CX (250 × 4.6 mmI.D.)
 移動相流速 : 0.5 mL/min
 反応液流速 : 0.5 mL/min
 温度 : 35 °C
 検出器 : VIS 440nm
 注入量 : 10 μL

サンプル(標準試料)

- | | |
|---------------------------------|----------|
| 1. Phosphoric acid (リン酸) | (1mg/mL) |
| 2. Tartaric acid (酒石酸) | (1mg/mL) |
| 3. Malic acid (りんご酸) | (1mg/mL) |
| 4. Formic acid (ギ酸) | (1mg/mL) |
| 5. Citric acid (クエン酸) | (1mg/mL) |
| 6. Lactic acid (乳酸) | (1mg/mL) |
| 7. Acetic acid (酢酸) | (1mg/mL) |
| 8. Succinic acid (コハク酸) | (1mg/mL) |
| 9. Pyroglutamic acid (ピログルタミン酸) | (1mg/mL) |

* 検出下限値と検量線 *

成分名	濃度(ug/mL)	相関係数
リン酸	12	0.998
酒石酸	16	1.000
りんご酸	13	0.999
ギ酸	10	0.999
クエン酸	15	1.000
乳酸	27	1.000
酢酸	19	0.995
コハク酸	15	0.999
ピログルタミン酸	43	0.999



有機酸分析の特長と分析システムの紹介

* 特長 *

有機酸分析の低コスト化

安価なシリカ系カラムを用いることで、分離カラムに要するコストを低減化できます。

高分離能

Inertsil® CX はシリカゲルベースのカラムのため、ポリマーベースのカラムに比べて拡散が少なく一定容積あたりの理論段数は高くなります。

分析時間の短縮

一般的な有機酸専用カラムを使用した場合と比較して、1分析に要する時間を25分に短縮できます。

耐圧性が高いシリカ系カラムを用いているため、流速を上げての短時間分析が可能です。

* イオン排除モード *

● 中性 ● 弱酸 ● 強酸

① 中性物質

浸透

② 弱酸性物質

弱反発

③ 強酸性物質

強反発



イオン排除モードは、充填剤のイオン交換基と、目的成分のイオン間の反発力の強弱により分離する方法です。

溶出時間の決定要因

1. 「細孔内への浸透」

電荷の大きさ(pKaの大きさ)により、細孔内への浸透力が決まります。

pKaが大きい=浸透力が大きい

2. 「充填剤の負電荷による静電的排除」

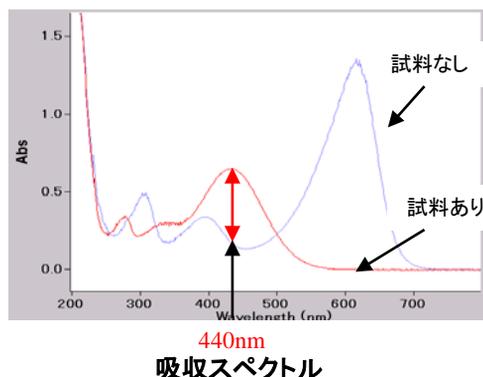
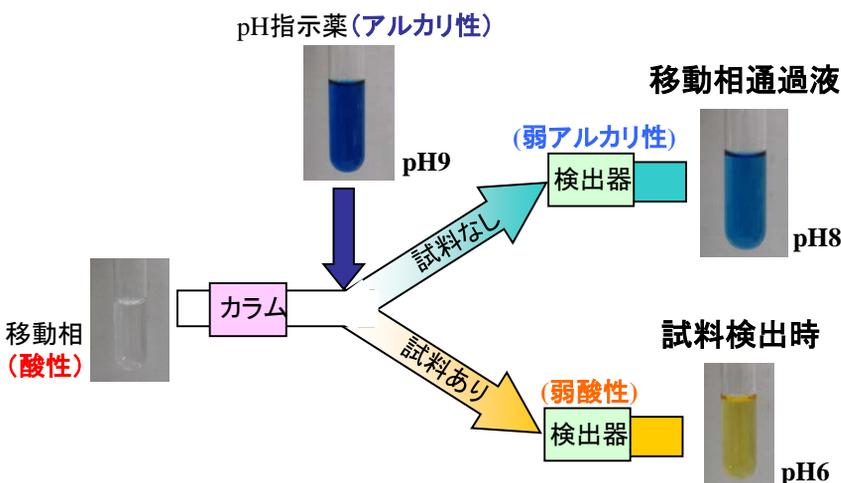
大きな負電荷をもつ(pKaが小さい)物質が、大きな静電気排除を受け、早く溶出します。

pKaが小さい=溶出が早い

イオン強度により分離しているため、陰イオン強度の強い成分ほど早く溶出します。
(溶出順序③→②→①)

* BTB(ブロモチモールブルー)法 *

BTB法はUV-VIS440nmにて検出するため、夾雑物の多い農作物やドレッシング、醤油などのサンプルでも選択性の高い分析ができます (Technical note No.1 参照)

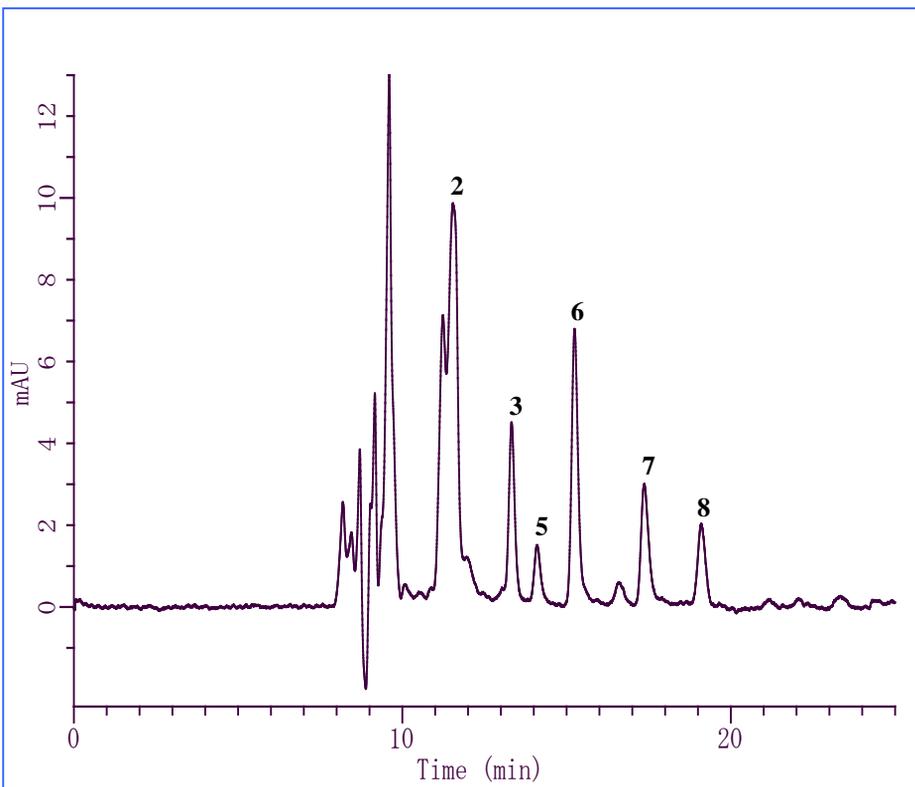


BTB試薬を使用すると、弱アルカリ性の移動相通過液では440nmの吸収は低く、弱酸性の試料検出時では440nmの吸収が高くなります。
この差を利用してピークを検出します。

* 応用分析例 *

有機酸はUV210nmに吸収がありますが、赤ワインやビールなどの醸造食品をUV210nmの低波長領域にて分析すると、多くの夾雑物が検出され、目的成分のみを定量することが困難になります。

しかし、BTB法を用いることで、検出波長を440nmにシフトできるため、有機酸のみを選択的に検出することが可能です。

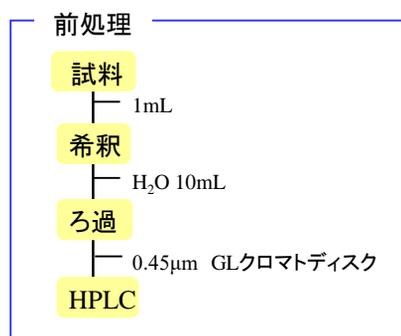


* 赤ワイン中の有機酸分析 *

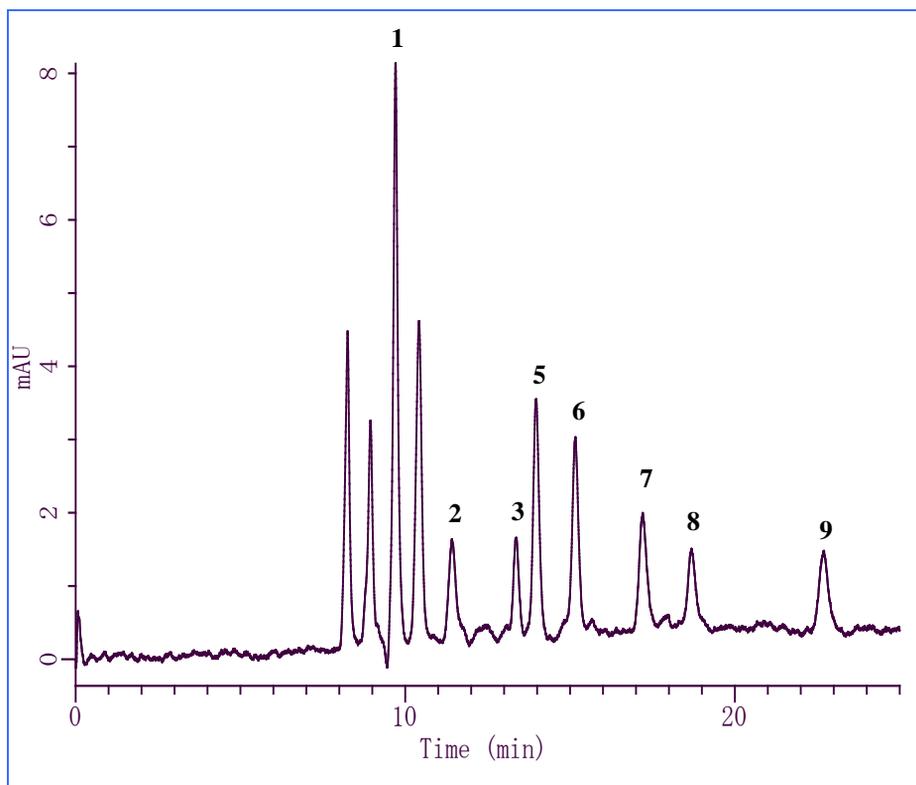


1. Phosphoric acid (リン酸)
2. Tartaric acid (酒石酸)
3. Malic acid (りんご酸)
4. Formic acid (ギ酸)
5. Citric acid (クエン酸)
6. Lactic acid (乳酸)
7. Acetic acid (酢酸)
8. Succinic acid (コハク酸)
9. Pyroglutamic acid (ピログルタミン酸)

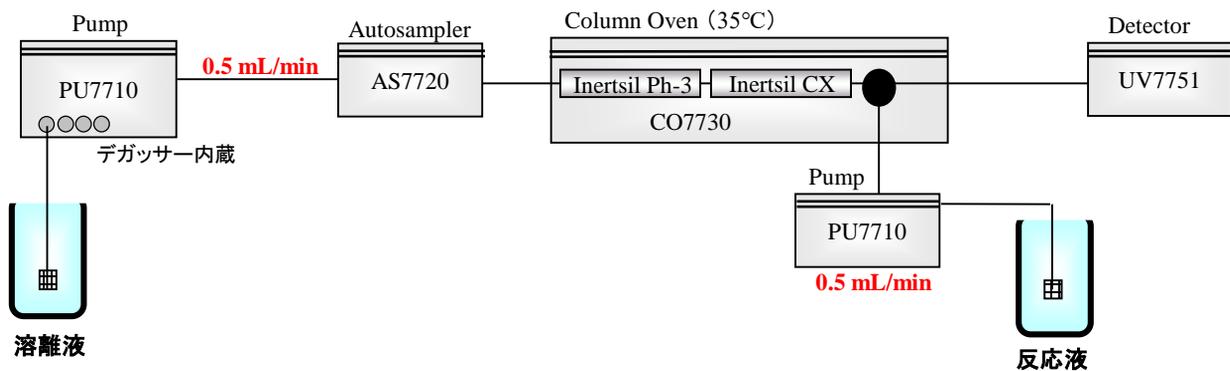
* ビール中の有機酸分析 *



1. Phosphoric acid (リン酸)
2. Tartaric acid (酒石酸)
3. Malic acid (りんご酸)
4. Formic acid (ギ酸)
5. Citric acid (クエン酸)
6. Lactic acid (乳酸)
7. Acetic acid (酢酸)
8. Succinic acid (コハク酸)
9. Pyroglutamic acid (ピログルタミン酸)



流路図



分析カラム

Inertsil Ph-3 5um 250 x 4.6 mmI.D. Cat.No. 5020-01921
Inertsil CX 5um 250 x 4.6 mmI.D. Cat.No. 5020-07146

	商品名	母体シリカゲル			化学修飾			
		粒径	表面積	細孔径	結合基	エンドキャップ	炭素量	イオン交換容量
Ph	Inertsil Ph-3	5um	450m ² /g	100 Å	フェニル基	無	10%	-
CX	Inertsil CX	5um	450m ² /g	100 Å	ベンゼンスルホン基	無	14%	0.5meqv/g

GLクロマトディスク

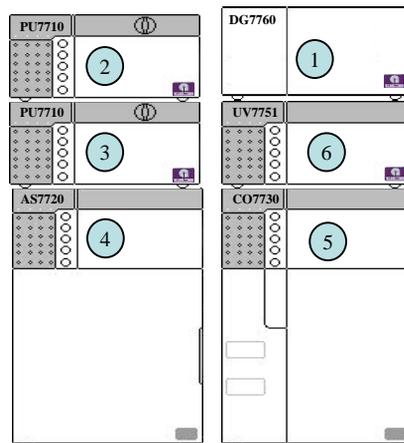
水系 25A 0.45 um フィルター
 Cat. No. 5040-28512
 価格 ¥ 21,000 (100個入)

使用装置

HPLC装置: GL7700 シリーズ

有機酸分析システム

1	デガッサー(リザーバー)	DG7760
2,3	ポンプ×2台	PU7710
4	オートサンプラー	AS7720
5	カラムオープン	CO7730
6	UV-VIS検出器	UV7751



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ても、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@gl.s.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.gl.s.co.jp/technique/app/app_search.html