



TOSOH

SEPARATION REPORT

TSKgel OApakを用いた有機酸の分析 (ポストカラム反応型検出)

— 目 次 —

	ページ
1. はじめに	1
2. ポストカラム反応型検出	1
3. 応用例	6
4. まとめ	6
5. 測定上の留意事項	6

1. はじめに

近年、HPLCによる有機酸分析においてイオン排除の分離モードでの分析が多用されています。

イオン排除型有機酸分析カラムTSKgel OApakは、従来のイオン排除型カラムよりも優れた分離特性を持っています。TSKgel OApakは陽イオン交換基をもつ親水性ポリマーゲルを用いておりその分離特性および電気伝導度、紫外吸光度検出法を中心とした応用分析例は、既にセパレーションレポートNo.76で報告しています。

本レポートでは、TSKgel OApakを用いた有機酸分析においてポストカラム反応型検出法について中心に検討を行い、その特徴および電気伝導度(CM)・紫外吸光度(UV)検出法との比較、実試料への応用についても検討を行ったので報告します。

2. ポストカラム反応型検出

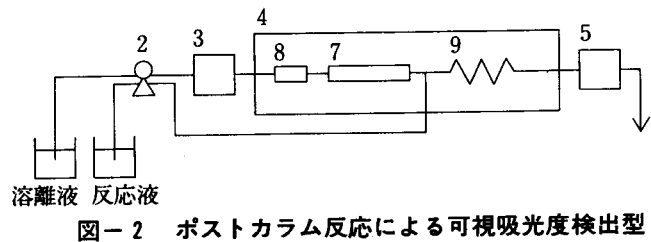
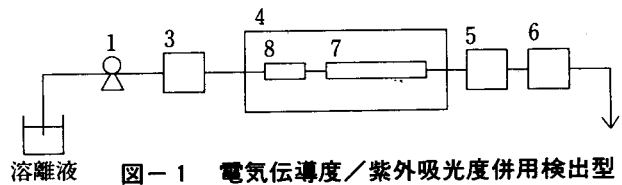
2-1. ポストカラム反応型検出法について

本レポートで検討したポストカラム反応型検出法では、分離した有機酸をpH指示薬であるBTB(ブロムチモールブルー)と混合し、BTBの変化を可視領域の波長の吸光度の変化として測定します。

2-2. 装置構成

- | | |
|------------------------|---------|
| 1. コンピュータコントロールデュアルポンプ | CCPD |
| 2. コンピュータコントロールマルチポンプ | CCPM |
| 3. オートサンプラ | AS-8010 |
| 4. カラムオープン | CO-8010 |
| 5. 紫外可視検出器 | UV-8010 |
| 6. 電気伝導度検出器 | CM-8010 |
| 7. TSKgel OApak-A | |
| 8. TSKgel OApak-P | |
| 9. 反応コイル 内径0.2mm、長さ5m | |

電気伝導度/紫外吸光度検出器の併用型システム構成を図-1に、ポストカラム反応型システム構成を図-2に示します。



2-3. 標準有機酸のクロマトグラム

標準有機酸8種を3種類の検出法を用いて測定したクロマトグラムを図-3に示します。

3つの検出法を比較すると、溶出の早い有機酸(ピルビン酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、ピログルタミン酸、乳酸)については、CM検出の場合が最も高感度で検出されますが、溶出の遅い有機酸(酢酸、コハク酸)についてはポストカラム反応型検出法の方がCM検出よりむしろピーク面積が大きく検出されることがわかります。

UV検出法の場合、ピログルタミン酸を除き他の2つの方法よりは感度は低下します。

参考として、表-1によく測定の対象となる有機酸のpKaを示します。

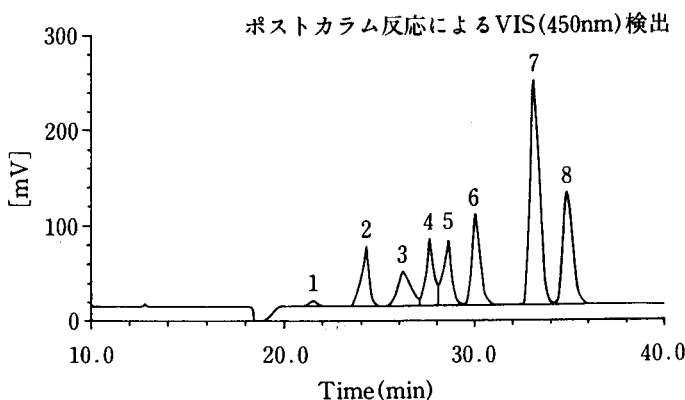
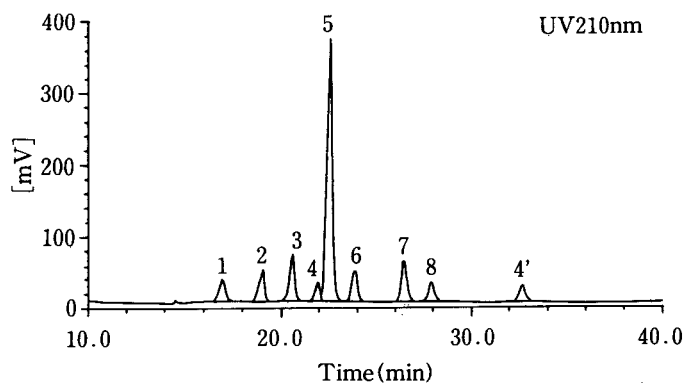
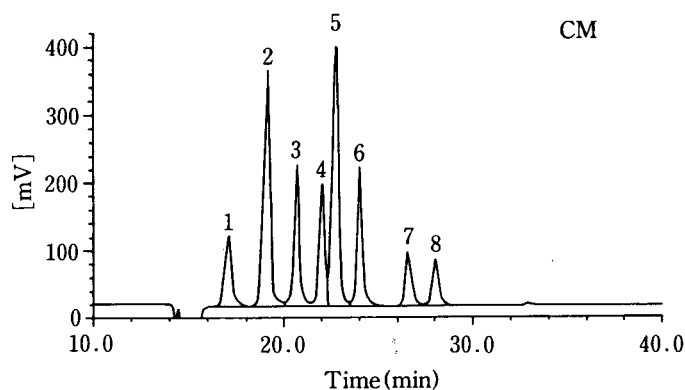


表-1

	pKa(pKa ₁)	pKa ₂	pKa ₃
シュウ酸	1.04	3.82	
ピルビン酸	2.26		
マレイン酸	1.75	5.83	
d,l-酒石酸	2.82	3.95	
グリオキシル酸	3.18		
クエン酸	2.87	4.35	5.69
グリコール酸	3.63		
リンゴ酸	3.24	4.71	
l-アスコルビン酸	4.03	11.34	
乳酸	6.66		
ギ酸	3.55		
酢酸	4.56		
マロン酸	2.65	5.28	
レブリン酸	4.44		
コハク酸	4.00	5.24	
プロピオン酸	4.67		
アクリル酸	4.26		
フマル酸	2.85	4.10	
n-酪酸	4.63		

図-3 標準有機酸のクロマトグラム(検出法比較)

カラム; TSKgel OApak-P (6mmI.D.×4cm)

TSKgel OApak-A (7.8mmI.D.×30cm×2)

溶離液; 0.75mM H₂SO₄

反応液; 0.2mM BTB-15mM Na₂HPO₄(pH8.6)

流速; 溶離液 0.8ml/min

反応液 0.8ml/min

温度; 60°C

反応コイル; 0.2mmI.D.×5m

検出; CM、UV(210nm)、VIS(450nm)

試料; 1.ピルビン酸(50ppm)

2.酒石酸(500)

3.クエン酸(500)

4.リンゴ酸(500)

4'リンゴ酸分解物

5.ピログルタミン酸(500)

6.乳酸(1000)

7.酢酸(2000)

8.コハク酸(1000)

2-4. 検量線データ

図-4に各検出法での検量線を示します。

各検量線とも広い濃度範囲(10~1000ppm程度)で良好な直線関係が得られています。各検量線での各有機酸の検出感度の変化は2-3でも述べたとおりの傾向を示しています。

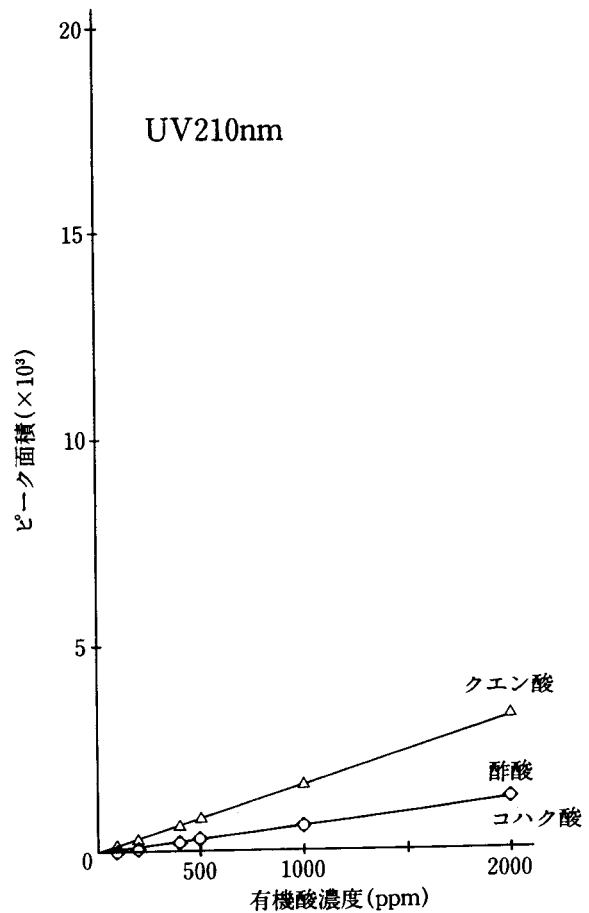
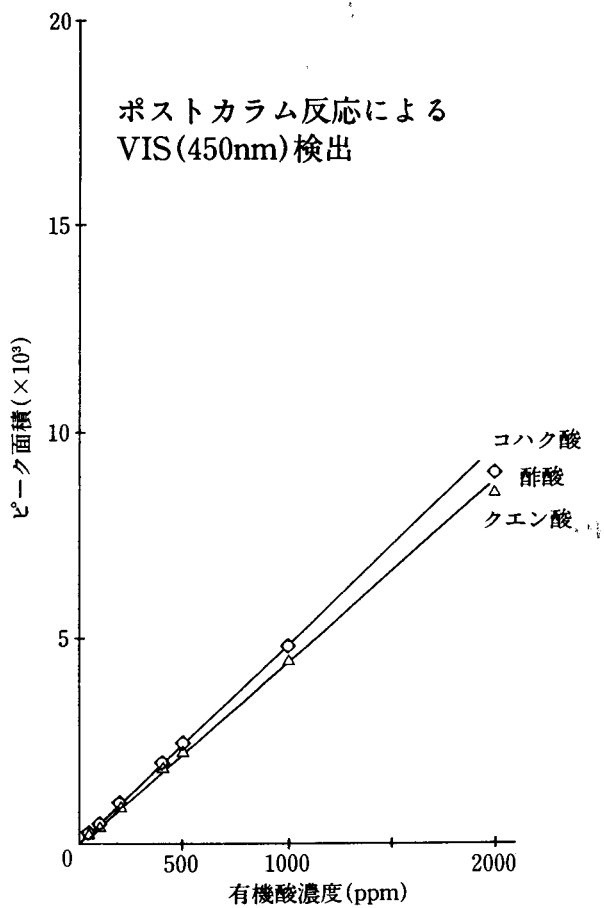
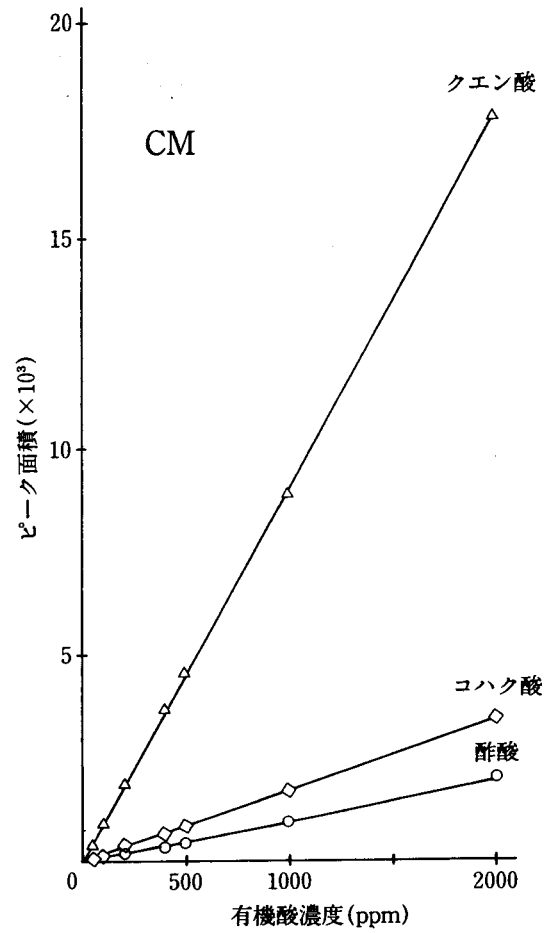


図-4 検量線データ(各検出法比較)

2-5. 検出限界

S/N=3での各有機酸の検出限界は以下の通りです。VIS検出では、溶出の遅い有機酸(酢酸、コハク酸)は、CM検出に比べ、高感度に検出できることを図-3で示しましたが、検出限界については、ポストカラム反応による影響(反応液混合によるノイズ)により、CM検出やUV検出の方が優れる、という結果になっています。

	酒石酸	クエン酸	酢酸	コハク酸
CM検出	0.13	0.25	1.2	1.2(ppm)
UV検出	0.49	0.81	1.8	2.2(ppm)
VIS検出	3.8	3.3	4.2	3.5(ppm)

注入量：20 μ l

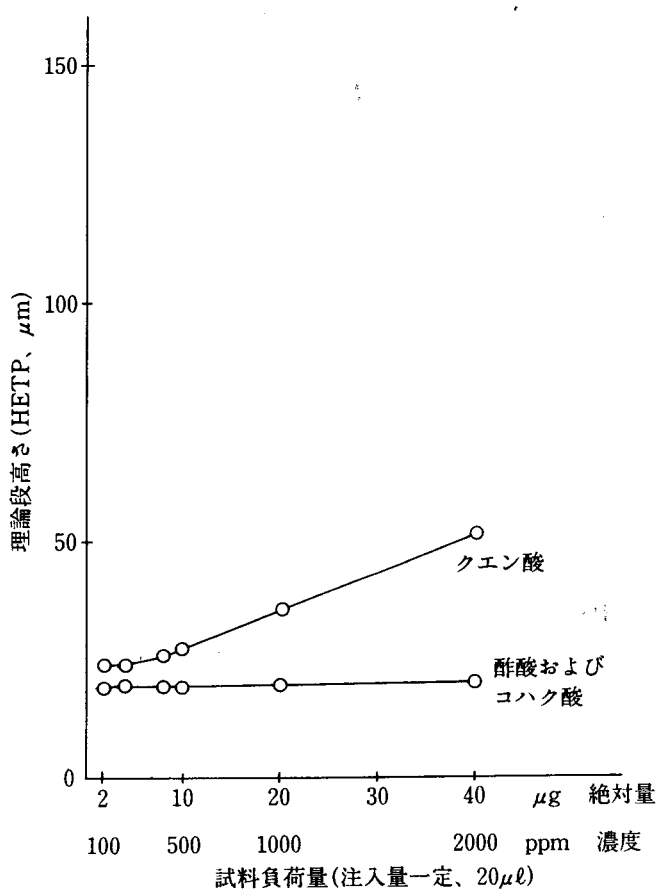


図-5 試料負荷量と理論段高さ①

2-6. 試料負荷量

図-5では、注入量を20 μ lに固定し濃度を変化させた場合の、図-6では100ppmに濃度を固定し注入量を変化させた場合の試料負荷量と理論段高さ(HETP)の関係を示しています。注入量20 μ lの場合、各有機酸ともそれほど大きなHETPの変化は見られませんが、一定濃度で注入量を増加するとHETPは顕著に増加する傾向が見られました。

以上のことからTSKgel OApak-P、-A各1本用いた場合の適当な試料負荷量は各有機酸500ppm以下の濃度で注入量は10~50 μ l程度(25 μ g以下)であることがわかります。

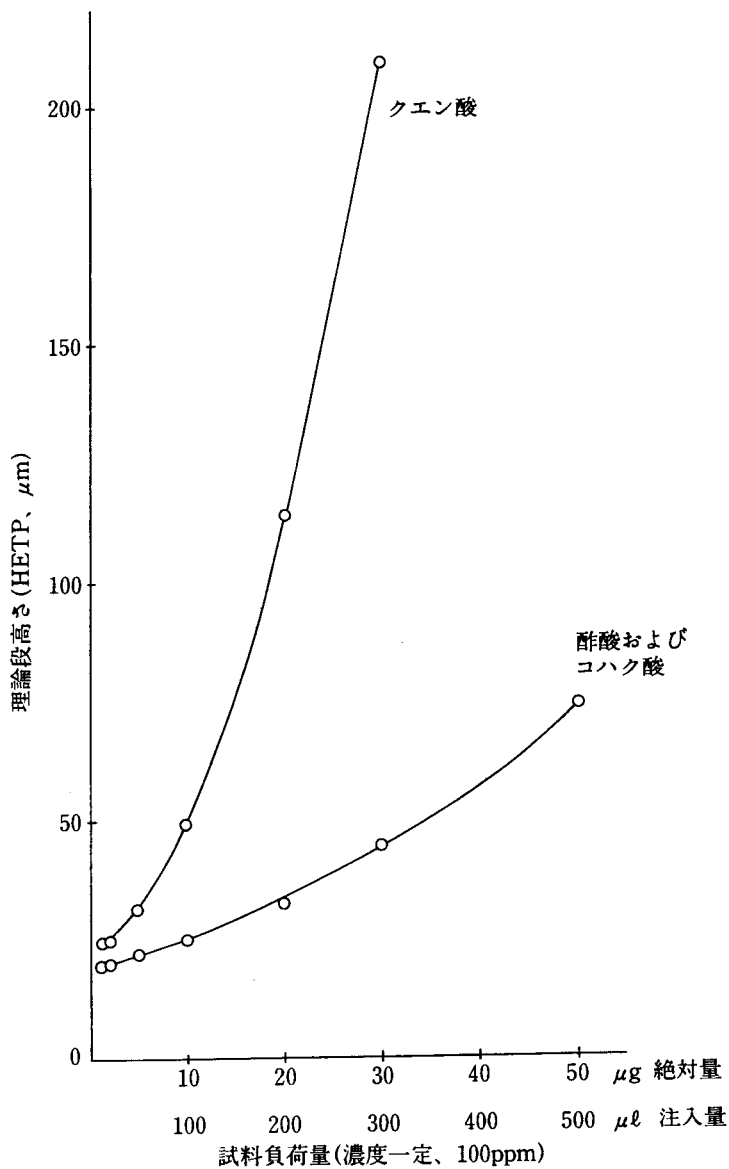


図-6 試料負荷量と理論段高さ②

2-7. 反応液流速と検出感度変化

ポストカラム反応型検出法において、溶離液流速を0.5 ml/minに固定したときの反応液流速に対する検出感度の変化を調べました(図-7)。

流速比(反応液/溶離液)が1.0程度以上になると各有機酸とも検出感度が低下する傾向がみられました。

2-8. 反応温度による検出感度変化

ポストカラム反応型検出法における反応温度による検出感度の変化を調べました(図-8)。反応温度は30~80°Cの範囲で検討しましたが、反応温度を上げても検出感度の向上はほとんど見られませんでした。カラムの耐久性等を考慮すると30~60°Cが適していると考えられますが、食品などの実試料中には、ピログルタミン酸が含まれていることが多く、これら試料の有機酸の分離においては、60°Cで行うのが適当と思われます。

ポストカラム反応-VIS検出法における溶離条件

カラム; TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

溶離液; 0.75mM硫酸(pH2.8)

流速; 0.5~1.0ml/min

反応液; 0.2mM BTB-15mM Na₂HPO₄(pH8.6)

反応液/溶離液混合比; 1.0以下(流速比)

温度; 60°C(温度により、試料の保持時間が変化する場合があります)

試料; 注入量: 10~50μl

濃度: 10~500ppm(検出限界約3 ppm)

システム; ポンプの動作はレシプロモードを使用

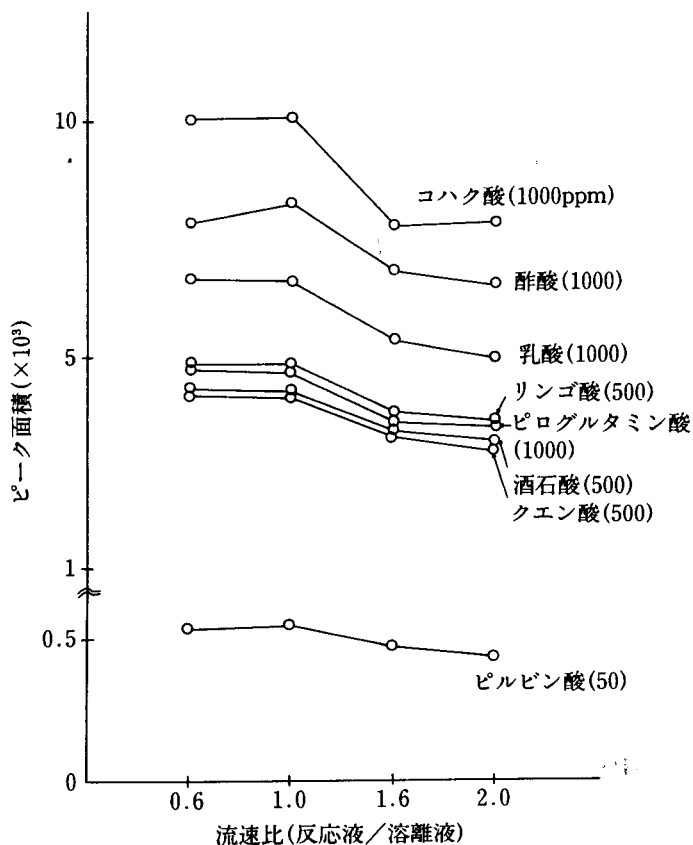


図-7 反応液流速による感度変化

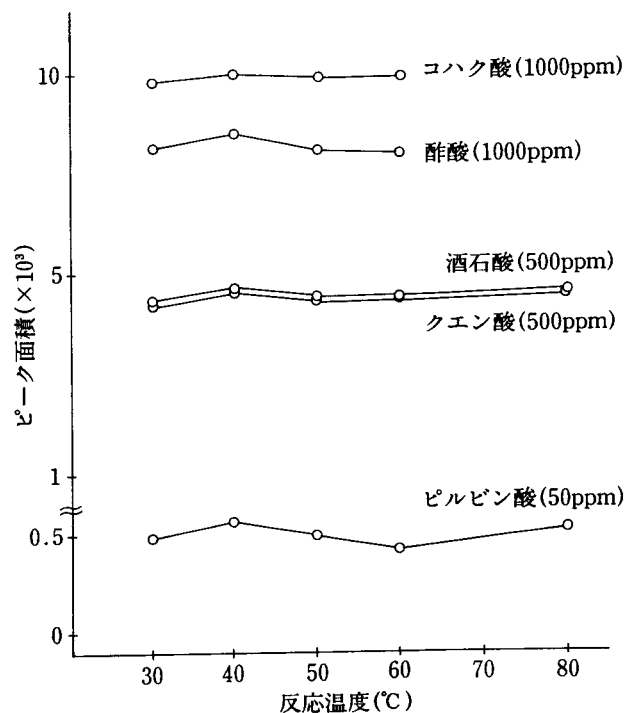


図-8 反応温度による感度変化

2-9. 反応液pHと検出感度

ポストカラム反応型検出法における反応液のpHによる検出感度の変化を検討しました(図-9)。pH 9付近で最も高感度検出が可能であることが分かります。

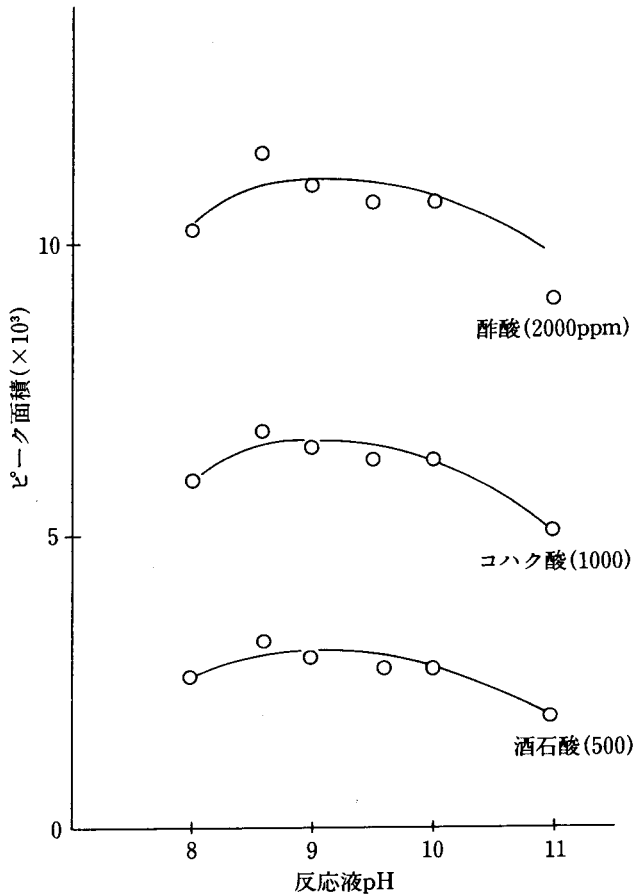


図-9 反応液pHと検出感度

3. 応用例

実試料としてワイン(白、赤)、日本酒、ビール、ウイスキー、みりん、しょうゆ、インスタントコーヒー、入浴剤のクロマトグラムを次ページより示します(図-10~図-18)。

各試料とも前処理として東ソー マイシヨリディスク(W-25-2、0.45 μ m)により濾過したのち、蒸留水により希釈しています。それぞれ良好なクロマトグラムが得られています。

日本酒、ワイン、ビール、ウイスキーなどの試料の場合、CM検出では乳酸のピークのあとにアルコールが負のピークとして現れますが、VIS検出の場合にはアルコールのピークは現れず、有機酸のみを選択的に検出しています。

また、しょうゆ、みりんなどの無機塩濃度の高い試料の場合、最初に排除される無機アニオンによるピークが現れ、その後に各有機酸が溶出します。

4. まとめ

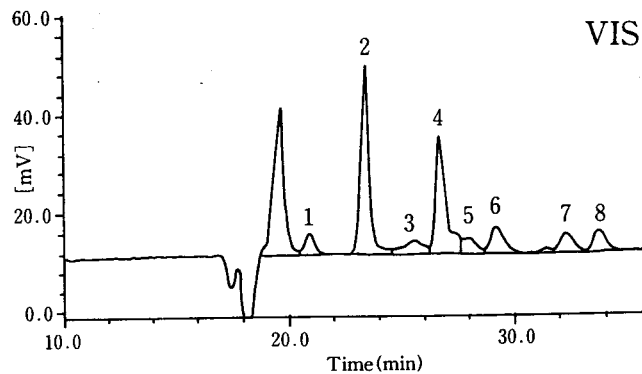
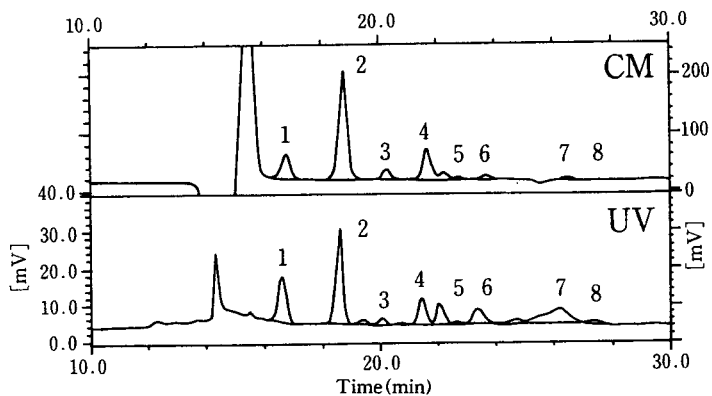
各検出法での比較結果およびポストカラム-VIS検出法の溶離条件をまとめると以下ようになります。

また測定上の留意事項を以下に示します。

	CM/UV 検出法	ポストカラム反応 -VIS検出法
検出感度	10~1000ppm 溶出の早い有機酸 (pKa<4)の検出 に優れる	10~1000ppm 溶出の遅い有機酸 (pKa>4)の検出 が一般的に高感度
選択性	やや劣るが、有機酸は、CM/UVのピーク高さ比に固有の値を示す	有機酸の選択性は高い
妨害物質	アルコールによる負のピーク 無機塩による正のピーク	アルコールのピークは出ない 無機塩によるピークの影響は比較的少ない
システム	検出器2台必要	シングルポンプ 2台必要 (CCPM 1台)

5. 測定上の留意事項

- 1) 有機酸分析用カラムTSKgel OApak-AにはプレカラムとしてTSKgel OApak-Pを必ずご使用下さい。
- 2) 溶離液調製法
0.75mM硫酸(pH2.8)
0.01M硫酸(容量分析用)を50mlはかりとり、これに蒸留水617mlを加えて希釈します。
- 3) 反応液(BTB法用)調製法
ブロムチモールブルー(特級)125mgとリン酸水素2ナトリウム(特級)2.13gをはかりとり、蒸留水1lに溶解します。
- 4) 測定後室温までカラム温度を下げる際には、送液しながら行って下さい。
- 5) 長期間運転しないときには、カラム及び配管を純水で置換して下さい。



カラム ; TSKgel OApak-P(4mmI.D.×6cm)
 TSKgel OApak-A(7.8mmI.D.×30cm×2本)

溶離液 ; 0.75mM H₂SO₄

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 60°C

検出 ; CM10μSFS

UV210nm

試料 ; 20μl、1.ピルビン酸

2.酒石酸

3.クエン酸

4.リンゴ酸

5.ピログルタミン酸

6.乳酸

7.酢酸

8.コハク酸

カラム ; TSKgel OApak-P(4mmI.D.×6cm)

TSKgel OApak-A(7.8mmI.D.×30cm×2本)

溶離液 ; 0.75mM H₂SO₄

反応液 ; 0.2mM BTB、15mM Na₂HPO₄

反応コイル ; 0.2mmI.D.×5m SUS

流速 ; 溶離液 0.8ml/min

反応液 0.8ml/min

温度 ; 60°C

検出 ; VIS450nm

試料 ; 20μl、1.ピルビン酸

2.酒石酸

3.クエン酸

4.リンゴ酸

5.ピログルタミン酸

6.乳酸

7.酢酸

8.コハク酸

図-10 白ワイン(10倍希釈)の分析

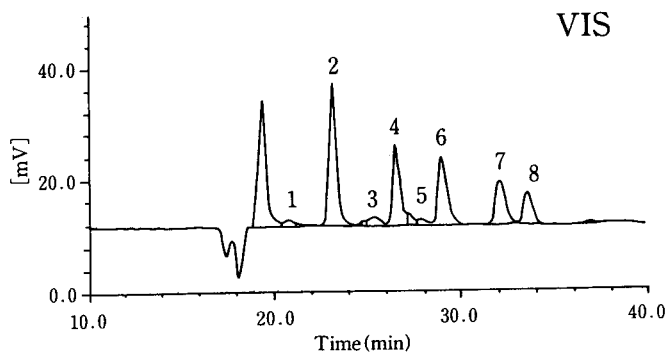
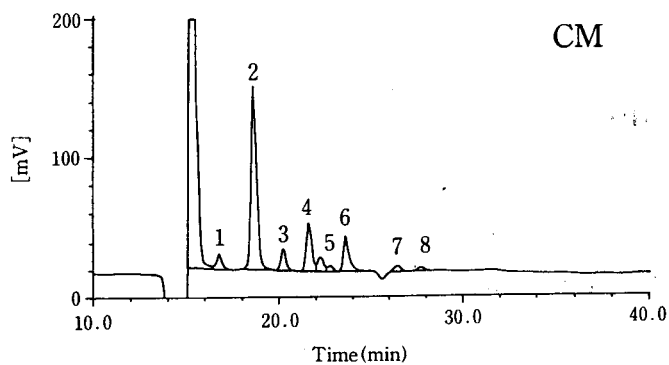


図-11 赤ワイン(10倍希釈)の分析

分析条件は図-10と同じ

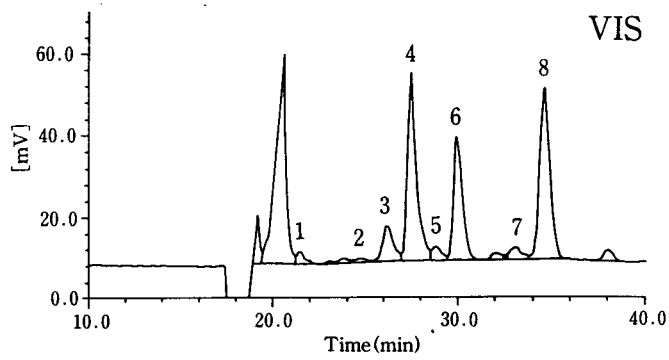
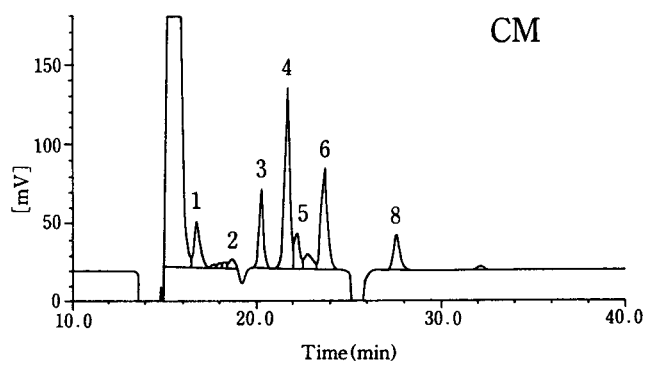


図-12 日本酒(原液)の分析

分析条件は図-10と同じ

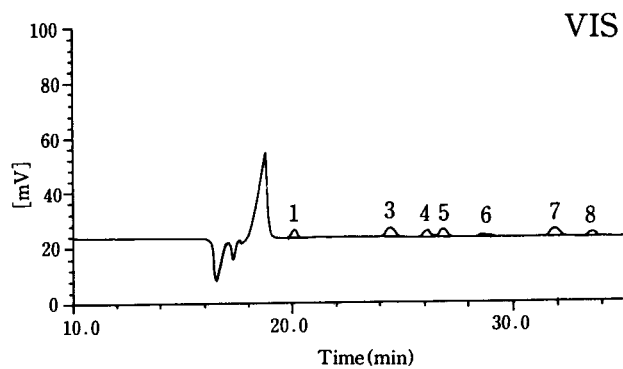
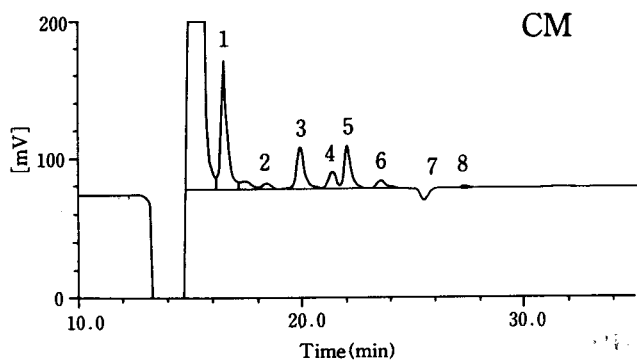


図-13 ビール(5倍希釈)の分析

分析条件は図-10と同じ

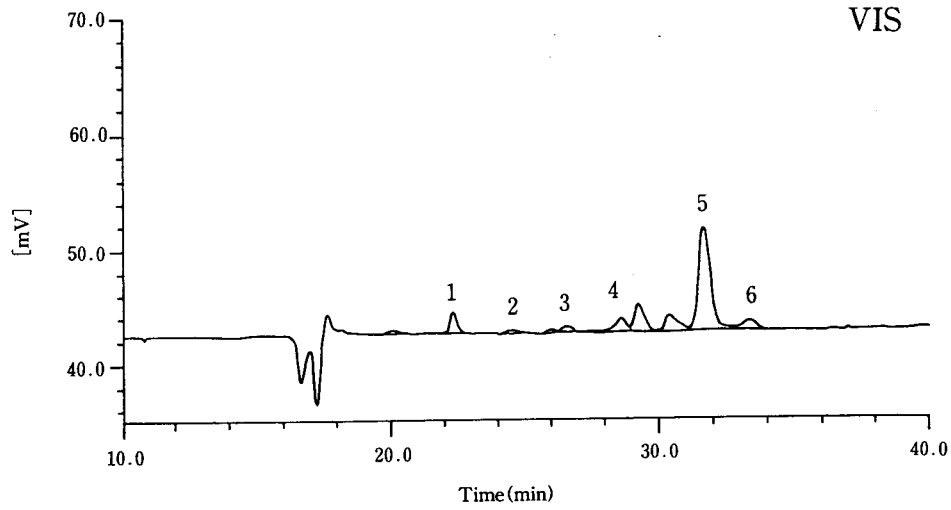


図-14 ウイスキー(原液)の分析

分析条件は図-10と同じ

試料：1. 酒石酸

2. クエン酸

3. ピログルタミン酸

4. 乳酸

5. 酢酸

6. コハク酸

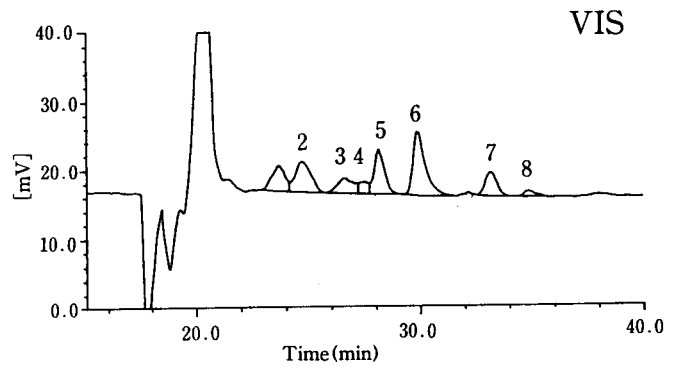
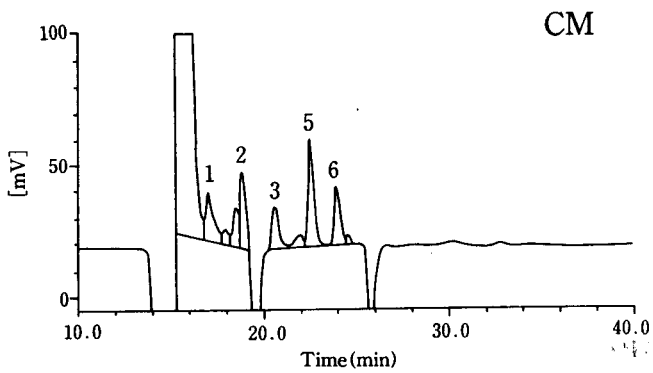


図-15 みりん(2倍希釈)の分析

分析条件は図-10と同じ

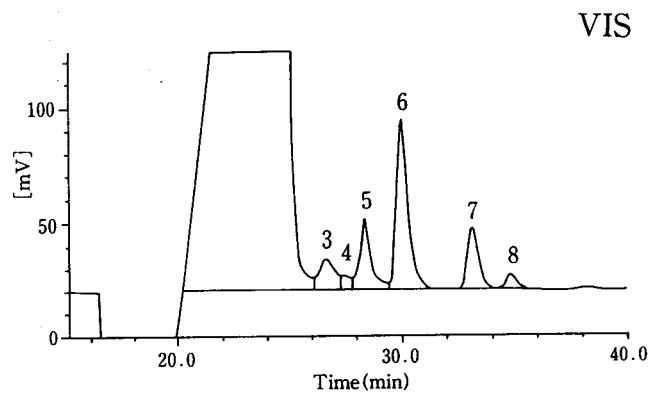
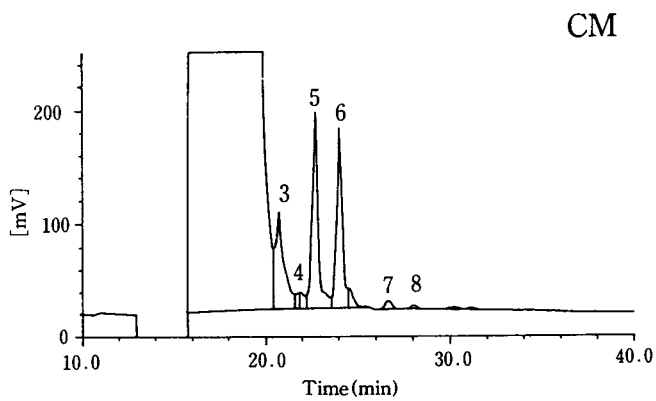


図-16 しょうゆ(10倍希釈)の分析
分析条件は図-10と同じ

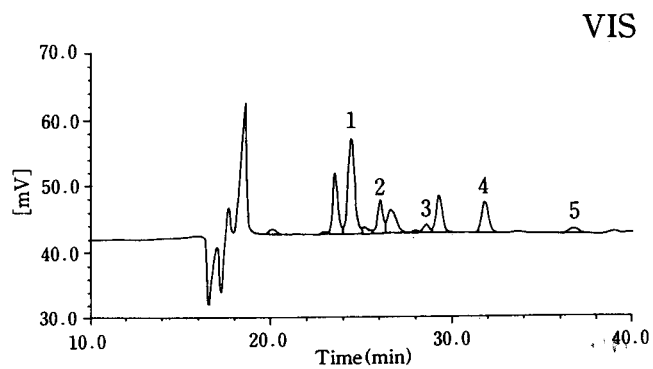


図-17 インスタントコーヒー(原液)の分析
分析条件は図-10と同じ

- 試料; 1.クエン酸
2.グリコール酸
3.乳酸
4.酢酸
5.プロピオン酸

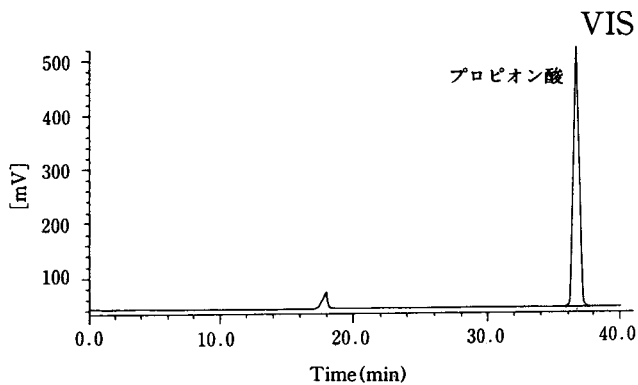


図-18 市販入浴剤(1%水溶液)の分析
分析条件は図-10と同じ