



SEPARATION REPORT

TSKgel OApakを用いた 有機酸の分析

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 有機酸の溶出挙動	1
3. 有機酸の検出法	5
4. 応用例	5
5. 測定上の留意事項	8

1. はじめに

有機酸は、食品のもつ特有な風味を示す重要な成分であり、天然物中及び食品添加剤中の有機酸を定量することは、食品の品質を管理するうえで重要です。また、食品分野のみならず医薬品、工業薬品の分野でも、有機酸は添加剤として、幅広く用いられています。

有機酸をHPLCにより分析する場合、基本的に3種の分離モードがあります。

- 1) イオン排除クロマトグラフィー
- 2) 陰イオン交換クロマトグラフィー
- 3) 逆相クロマトグラフィー

これらの分離モードのうち、高感度、同定の信頼性、多種の有機酸の同時分析という観点から最も一般的に用いられているのは、イオン排除クロマトグラフィーによる分析です。

イオン排除クロマトグラフィーは、固定相と移動相(溶離液)間でのDonnan膜平衡に基づく浸透作用を基本原理としており、固定相に陽イオン交換樹脂を、溶離液に

は水または強酸溶液を用いています。

そして検出法では、これまで紫外吸光度検出法および電気伝導度検出法、あるいは高選択的に検出するためのpH指示薬を用いたポストカラム反応による可視吸収検出法などが導入されています。

本報では当社が新しく開発した有機酸分析用充填カラムTSKgel OApak-A,Pの基本的特性と応用例についてご報告致します。

2. 有機酸の溶出挙動

1) 溶離液の種類

図-1に硫酸、過塩素酸、リン酸を溶離液としたときのクロマトグラムを示します。

過塩素酸及びリン酸の場合には、電気伝導度検出法において有機酸の溶出する位置にシステムピークを生じます。種々の溶離液を検討した結果、TSKgel OApak-A,Pの溶離液には希硫酸(0.75mM)を用いることが適当です。

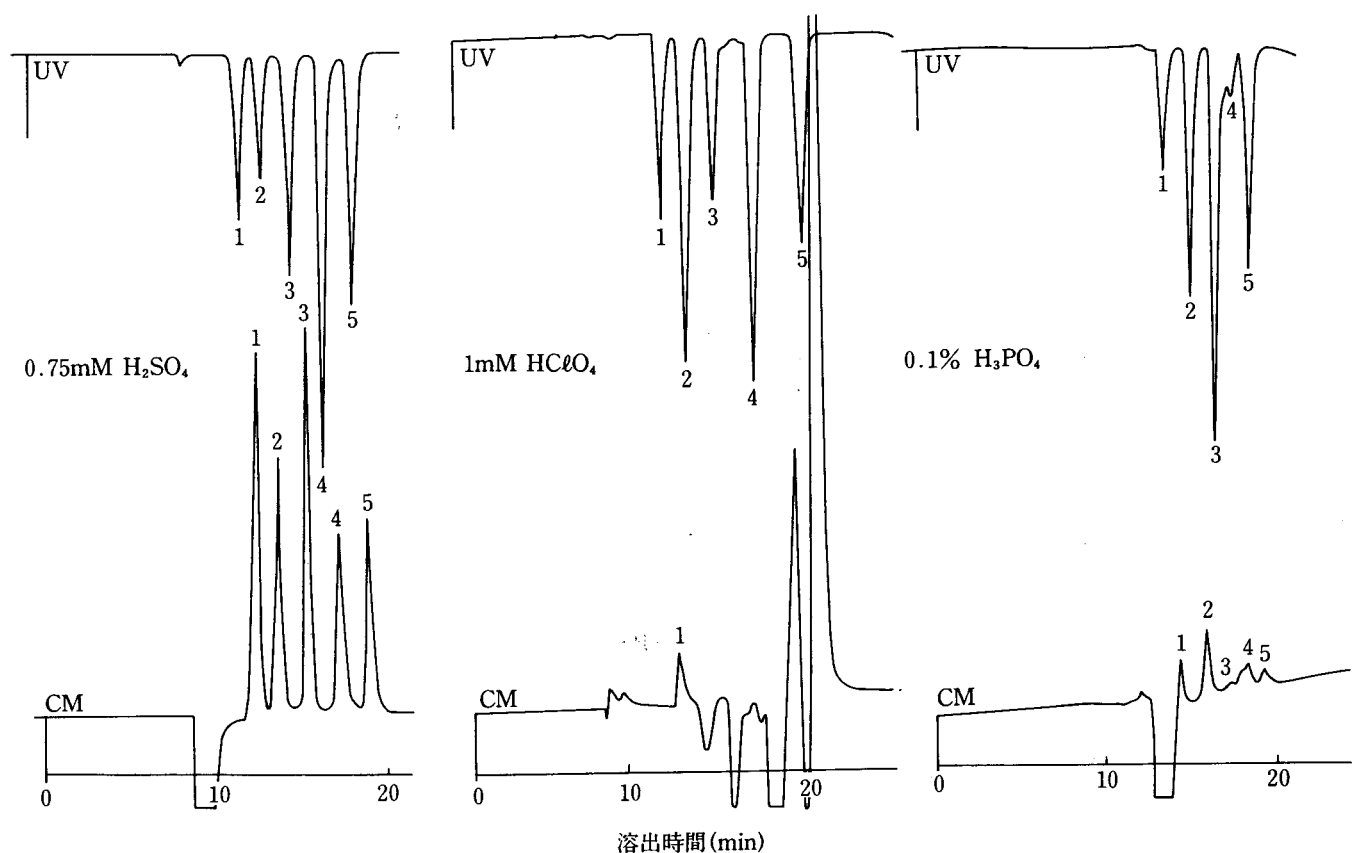


図-1 各種溶離液による有機酸の分離

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

流速；0.8ml/min

温度；40℃

検出；UV(210nm)、CM

試料；1.酒石酸、2.クエン酸、3.乳酸、4.酢酸、

5.コハク酸

2) 溶離液の濃度

溶離液の硫酸の濃度を0.5~1.5mMまで変えたときの溶出量の関係を図-2に示します。溶離液の濃度が高くなると、カルボキシル基の解離が抑制されるため有機酸の溶出は遅れますが、あまり濃度を高くすると電気伝導度のバックグラウンドが高くなり、感度は低下します。

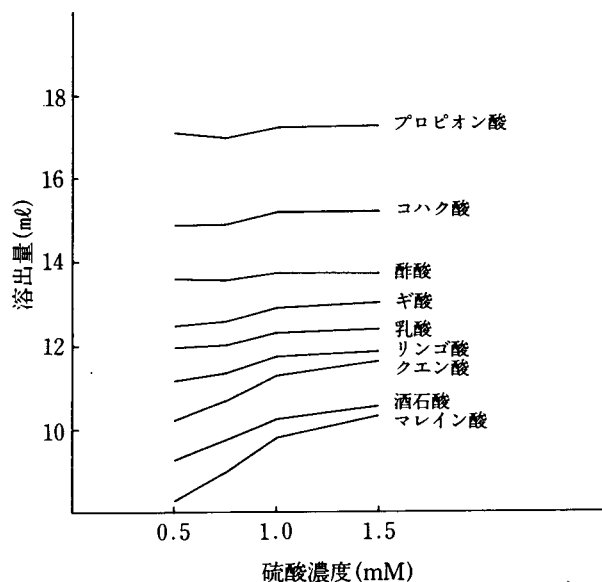


図-2 溶離液濃度と溶出量の関係

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A
6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

流速；0.8ml/min

温度；40℃

3) 測定温度

有機酸の溶出量と測定温度の関係を図-3に示します。測定温度が上がると溶出は早くなりますが、有機酸の種類によりその程度は異なります。

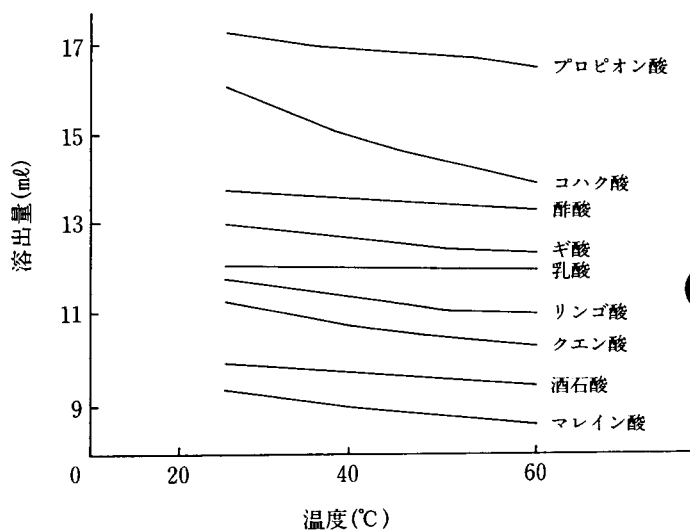


図-3 測定温度と溶出量の関係

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A
6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

溶離液；0.75mM H₂SO₄

流速；0.8ml/min

4)測定流速

流速を0.3~1.0ml/minまで変化させたときの分離度Rs(酒石酸/クエン酸)と圧力損失との関係を図-4に示します。このグラフより流速が低い程、分離能は向上することが分ります。

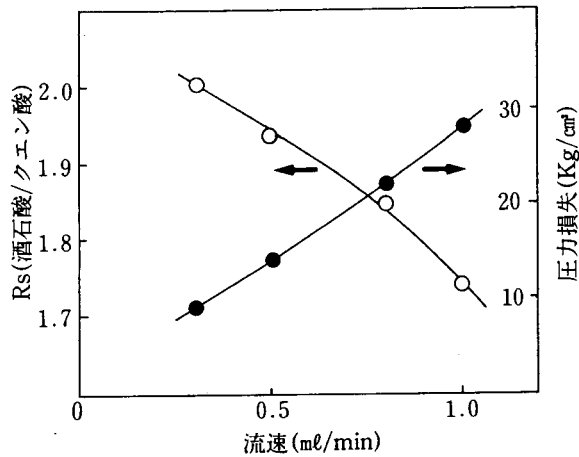


図-4 流速と分離能及び圧力損失との関係

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

溶離液；0.75mM H₂SO₄

温度；40℃

5)溶離液への有機溶媒の添加効果

有機溶媒にアセトニトリルを用いて、添加量と有機酸の溶出量との関係を図-5に示します。有機溶媒を添加することによって溶出はかなり早くなります。特に疎水性の強い有機酸には効果的です。

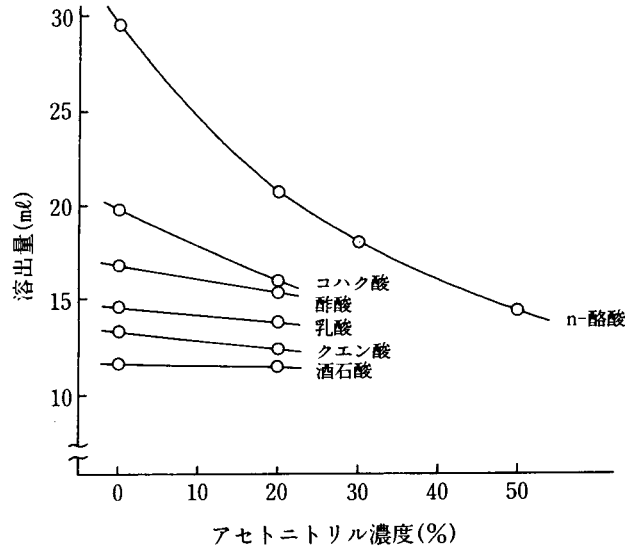


図-5 有機溶媒添加量と溶出量の関係

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

溶離液；0.75mM H₂SO₄+アセトニトリル

流速；0.8ml/min

温度；40℃

6)定量性

酒石酸、クエン酸、乳酸、酢酸について電気伝導度検出法における検量線を図-6に示します。いずれも良い直線性が得られています。

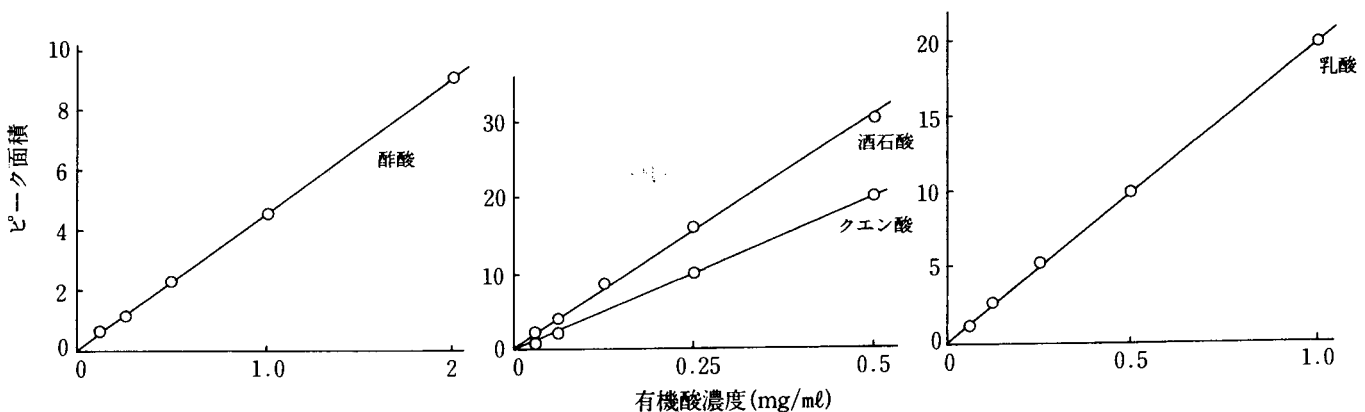


図-6 各種有機酸の検量線

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

溶離液；0.75mM H₂SO₄

流速；0.8ml/min

温度；40℃

検出；CM

試料；100μl

7) 各種有機酸の溶出位置

図-7に有機酸28種の溶出位置を示します。

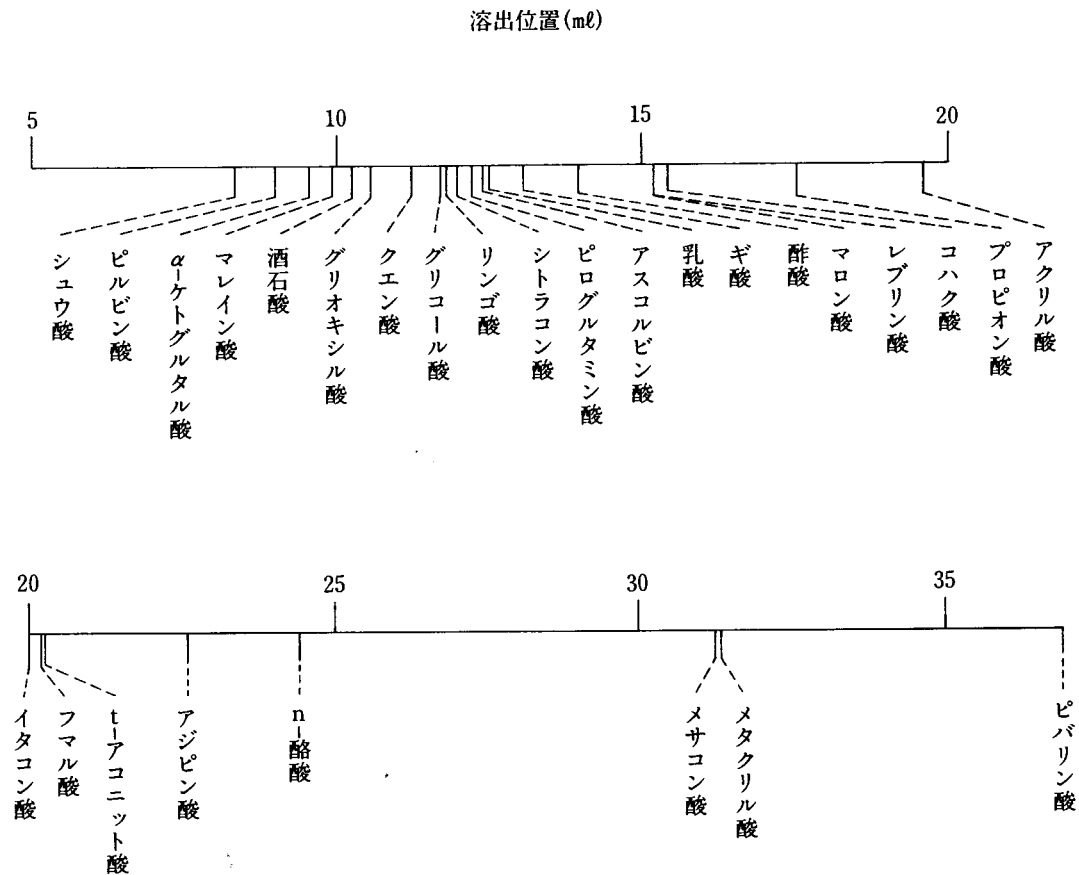


図-7 各種有機酸の溶出位置

カラム；TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

流 速；0.5ml/min

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

温 度；40℃

溶離液；0.75mM H₂SO₄

8) 検出限界

クエン酸、乳酸、酒石酸の電気伝導度検出法による検出限界を表-1に示します。

	検出限界(S/N=3)
クエン酸	6.40×10 ⁻⁷ M(0.12ppm)
乳酸	1.36×10 ⁻⁶ M(0.12ppm)
酢酸	3.47×10 ⁻⁶ M(0.21ppm)

表-1 各種有機酸の検出限界

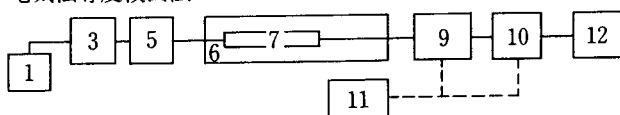
分析条件；図-6と同じ

3. 有機酸の検出法

分離した有機酸を検出する場合、有機酸そのものを測定する電気伝導度検出器を用いる方法あるいは有機酸をポストラベル誘導体化したのちに可視検出器を用いて選択的に検出する方法等があります。前者は後者に比べると高感度、システム構成の簡略化などの点で優れており、イオン排除クロマトグラフィーでは、電気伝導度検出法が一般的であると言えます。TSKgel OApak-A,Pを用いた有機酸分析計では溶離液として低濃度の硫酸を用いていますので高感度な電気伝導度検出を行うことができます。さらに紫外検出器を併用することにより同定の信頼性を補うことができます。また、BTB(ブロムチモールブルー)pH指示薬と反応させたのちに可視吸光を用いて検出する方法は、有機酸のみを選択的に検出することができますので夾雑物の多い試料に非常に有効です。電気伝導度検出法の場合には、酸解離定数(pKa)の比較的大きい有機酸(例えば酢酸、コハク酸、プロピオン酸、酪酸など)はかなり感度が低下しますが、BTB法の場合には各有機酸に対して、平均的に高感度な検出ができます。

電気伝導度検出法及びBTB法のシステム構成は図-8に示す通りです。

電気伝導度検出法



BTB法

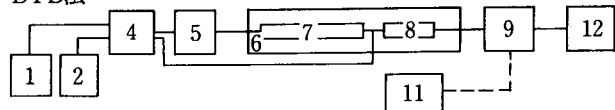


図-8 システム構成図

1. 溶離液
2. 反応液
3. 送液ポンプ(CCPS又はCCPM-II)
4. 送液ポンプ(CCPM-II)
5. オートサンプラ(AS-8020)
6. カラムオープン(CO-8020)
7. 分析カラム
8. 反応コイル(0.2mm×5m)
9. 紫外可視検出器(UV-8020)
10. 電気伝導度検出器(CM-8020)
11. スーパーシステムコントローラ(SC-8020)
12. 廃液

4. 応用例

標準試料のクロマトグラムを図-9、実試料として日本酒、ワイン、果汁、アイソトニック飲料、醤油のクロマトグラムを図-10~14に示します。

前処理は、試料前処理カートリッジ「マイショリディスク(東ソー製)」により濾過した後、蒸留水により希釈しています。

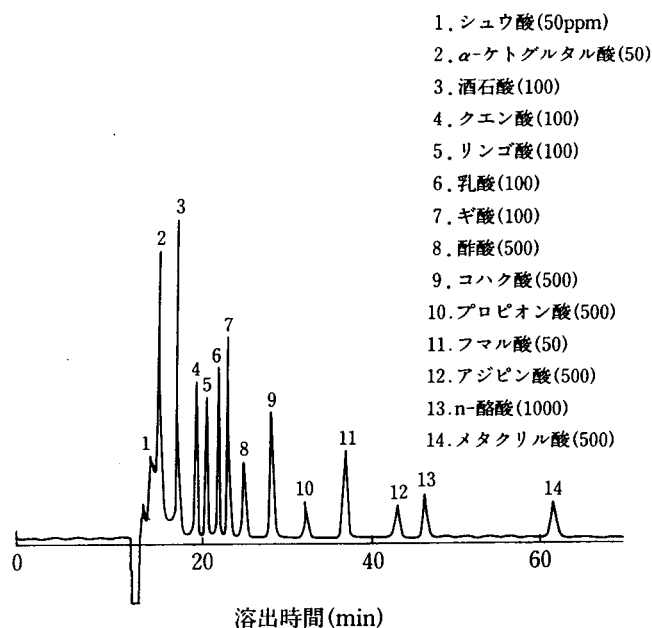


図-9 標準試料のクロマトグラム

カラム; TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A×2

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm×2

溶離液; 0.75mM H₂SO₄

流速; 1.0ml/min

温度; 40°C

検出; CM

試料; 20μl

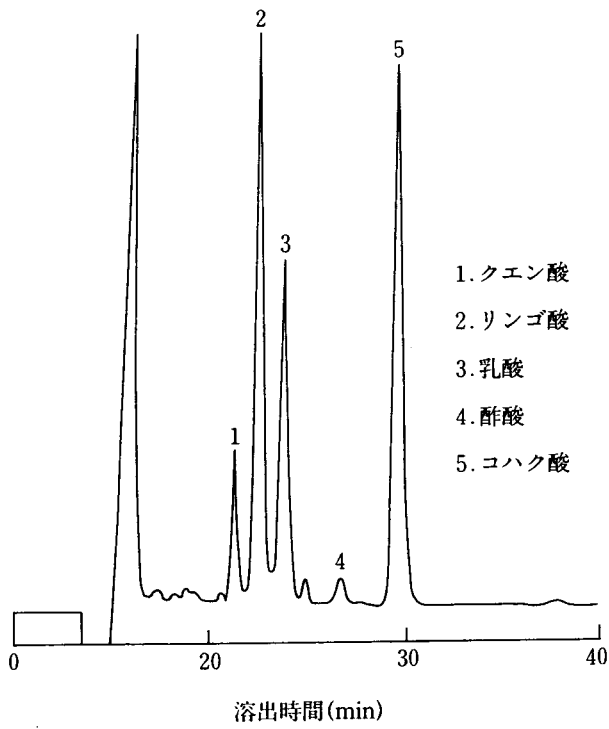


図-10 市販日本酒のクロマトグラム

カラム; TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm

溶離液; 0.75mM H₂SO₄(0.5ml/min)

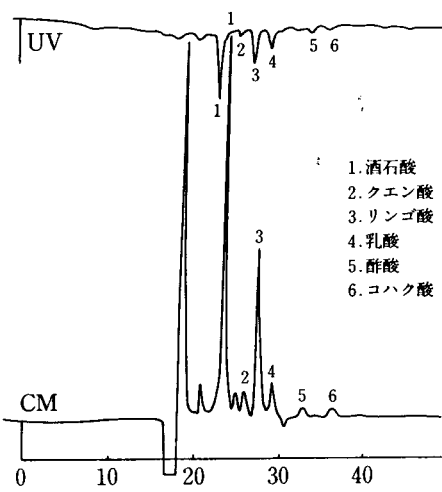
反応液; 15mM Na₂HPO₄+0.2mM BTB(0.5ml/min)

温度; カラム、反応とも40°C

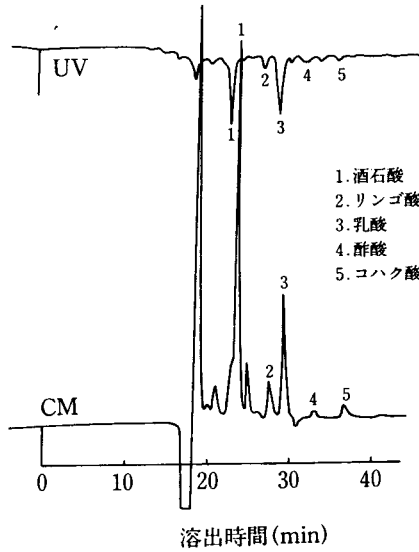
検出; VIS(450nm)

試料; 20μl

●市販白ワイン



●赤市販ワイン



●市販ロゼワイン

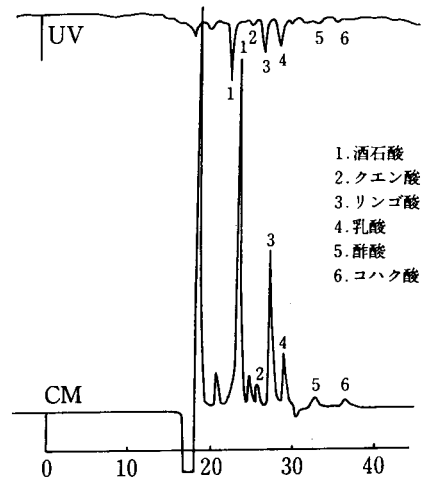


図-11 各種市販ワイン中の有機酸の分析

カラム; TSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A×2

6.0mmID×4cm+7.8mmID×30cm×2

溶離液; 0.75mM H₂SO₄

流速; 0.8ml/min

温度; 40°C

検出; UV(210nm)、CM

試料; 各10倍希釈50μl

● オレンジ

● グレープフルーツ

● グレープ

● アップル

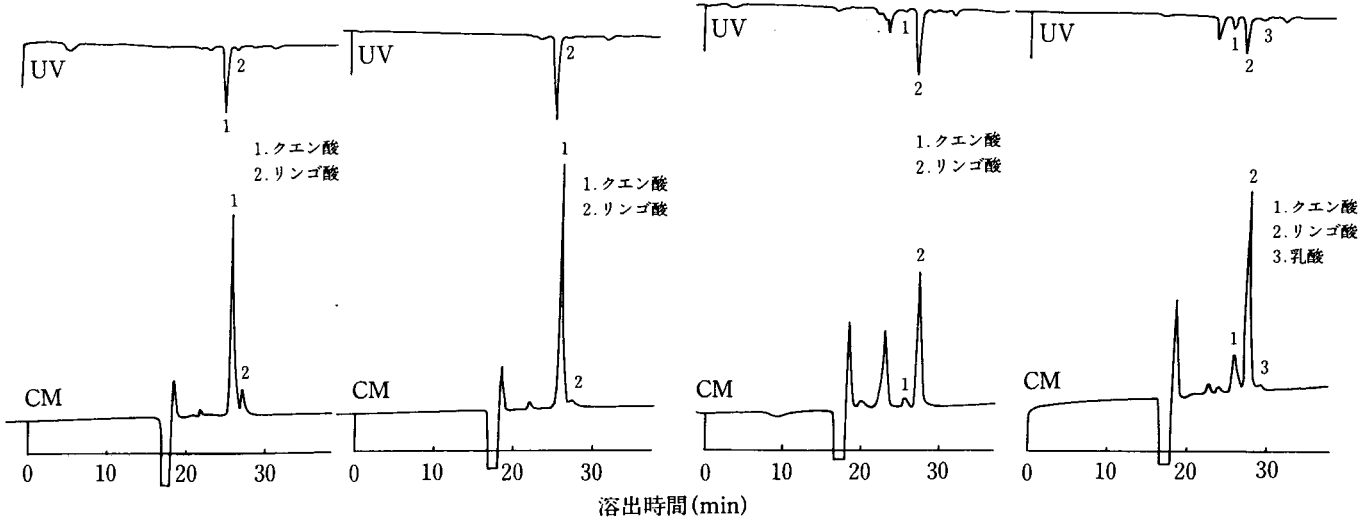


図-12 各種果汁中の有機酸の分析

分析条件；試料を除き図-11と同じ

試料；各50倍希釈50 μ l

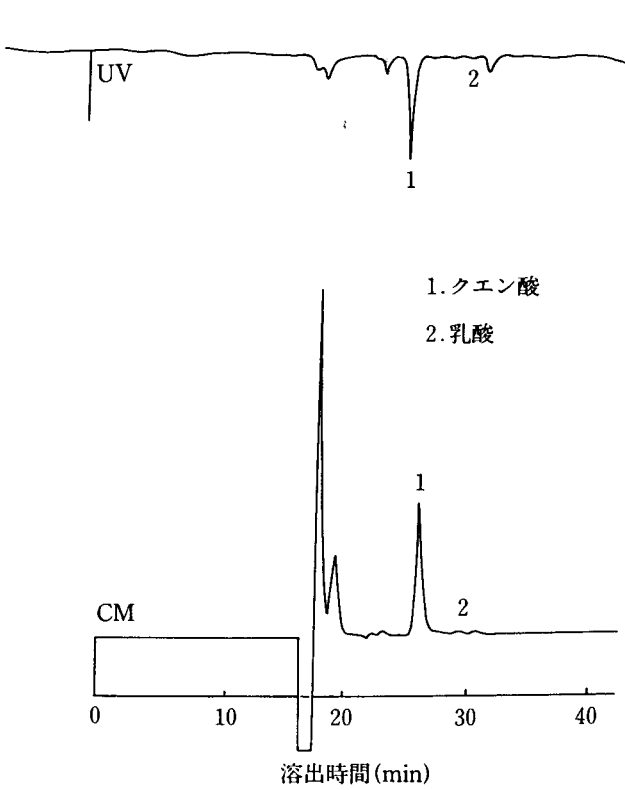


図-13 市販アイソトニック飲料中の有機酸の分析

分析条件；試料を除き図-11と同じ

試料；25倍希釈100 μ l

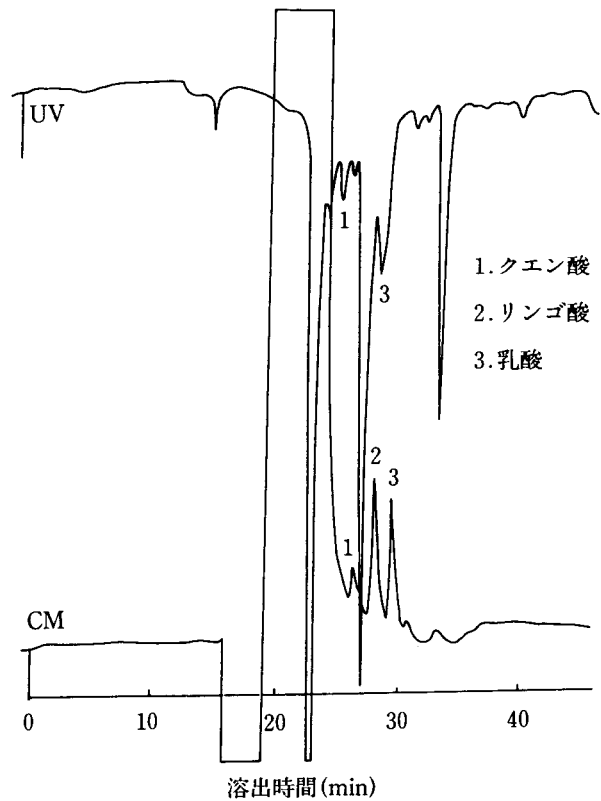


図-14 市販醤油中の有機酸の分析

分析条件；試料を除き図-11と同じ

試料；10倍希釈20 μ l

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、これにイオン交換水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、イオン交換水1ℓに溶解します。
- 4) 測定後室温までカラム温度を下げる時には、送液しながらおこなって下さい。
- 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。