

イオン排除カラムを用いた 有機酸の保持挙動確認

著者

松下 邦明
アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

有機酸分析は、食品中の成分分析としてよく行われる分析の1つです。複数の有機酸を分離分析したい場合、クロマトグラフィーを用います。

このアプリケーションノートでは、イオン排除クロマトグラフィーを用い、複数の分析条件下での有機酸の保持挙動を確認したデータについて紹介します。

はじめに

有機酸は食品分析において、しばしば対象となる化合物群の 1 つです。例えば、日本農林規格（JAS）では醸造酢の酸度分析に滴定が規定されており、食酢中の酢酸分析には中和滴定が用いられます。一方、多くの食品中有機酸分析では、ガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーといったクロマト手法が用いられます。液体クロマトグラフィーでよく用いられる分析モードは、逆相分配クロマトグラフィーですが、この手法では、極性の高い有機酸の保持は無いが弱く、分離分析が困難であることが知られています。最近では、高極性な分析種の分析に適した親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）も使われていますが²、移動相に多くの有機溶媒を使う、水系試料をそのまま注入するとピーク形状が乱れるなど、日常的に用いる分析手法としては使いづらいとされる点も多く指摘されています。

一方、イオン排除クロマトグラフィーは、移動相が酸の水溶液であることや、水系試料がそのまま注入できるなど簡便であることから、有機酸分析によく用いられます。しかしながら、複数の有機酸を分離するためには、移動相に使用する酸の選択や濃度、カラム温度など分析条件の最適化が必要とされます。

そこで今回は、イオン排除カラムを用いた有機酸分析メソッド構築の参考となるよう、29 種類の有機酸と分析対象となることが多いリン酸を加えた 30 種類の酸について、5 種類の移動相条件と 40 °C および 60 °C の 2 種類のカラム温度、即ち 10 種類の条件での保持挙動を確認しました。その結果を報告します。

システム

表 1. 分析条件

型番	装置名
G7112B	1260 Infinity II バイナリポンプ
G7129A	1260 Infinity II バイアルサンブラ サンプルサーモスタット装着
G7116B	1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット
G7162A	1260 Infinity II 示差屈折率検出器

実験方法

材料

水は、超純水製造装置で製造した比抵抗 18.2 MΩ・cm 以上のものを用いました。

水以外の試薬は、試薬会社からの購入品を用いました。

試料調製

分析に用いた酸は、それぞれ 1 mg/mL となるよう調製し、個別に HPLC に注入しました。

移動相調製

移動相は、以下の 5 種類を調製し、用いました。

- 5 mM 硫酸水溶液
- 0.1 % トリフルオロ酢酸水溶液
- 0.1 % ギ酸水溶液
- 1 mM 過塩素酸水溶液
- 6 mM 過塩素酸水溶液

分析条件

表 2 の条件で分析しました。

表 2. 分析条件

パラメータ	
HPLC カラム	Agilent Hi-Plex H, 7.7x300 mm, 8 μm (P/N PL1170-6830)
移動相	表 3 に記載
流速	0.6 mL/min
注入量	10 μL
オートサンブラ温度	10 °C
カラム温度	表 3 に記載
検出	示差屈折率

結果および考察

それぞれの分析条件での酸の保持時間を、表 3 に示します。

表 3. Agilent Hi-Plex H カラムでの酸の保持時間 (min)

移動相	5 mM 硫酸		0.1 % トリフルオロ酢酸		0.1 % ギ酸		1 mM 過塩素酸		6 mM 過塩素酸	
	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60
カラム温度 (°C)	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60
シュウ酸	7.565	7.505	7.853	7.837	7.135	7.064	7.098*	7.039*	7.481	7.446
リン酸	8.652	8.855	9.048	9.330	7.779	7.902	7.532*	7.632*	8.496	8.748
グルクロン酸	8.672	8.676	8.745	8.759	8.380	8.372	8.078	8.107	8.627	8.645
クエン酸	8.955	8.788	9.060	8.910	8.528	8.358	8.195	8.064	8.889	8.740
isoクエン酸	9.040	8.841	9.117	8.930	8.712	8.510	8.386	8.223	8.987	8.805
マレイン酸	9.179	8.953	9.887	9.699	7.890	7.767	7.560*	7.478*	8.920	8.793
ガラクトツロン酸	9.221	9.157	9.282	9.224	8.980	8.908	8.710	8.677	9.182	9.127
α-ケトグルタル酸	9.229	8.999	9.771	9.593	8.037	7.882	7.643*	7.534*	9.004	8.852
酒石酸	9.374	9.204	9.522	9.369	8.811	8.648	8.415	8.301	9.289	9.146
グリオキシル酸	10.093	10.062	10.195	10.179	9.684	9.624	9.363	9.338	10.034	10.017
ピルビン酸	10.129	10.078	10.670	10.773	8.740	8.621	8.201*	8.113*	9.892	9.903
リンゴ酸	10.375	10.151	10.461	10.248	9.993	9.768	9.631	9.451	10.318	10.109
キナ酸	10.707	10.566	10.785	10.647	10.358	10.211	9.968	9.863	10.649	10.518
マロン酸	10.716	10.435	11.006	10.755	9.693	9.475	9.111*	8.967*	10.557	10.336
シキミ酸	12.575	12.090	12.612	12.125	12.442	11.944	12.224	11.777	12.536	12.057
グリコール酸	12.641	12.449	12.701	12.515	12.369	12.166	12.049	11.898	12.591	12.410
コハク酸	12.734	12.211	12.760	12.241	12.593	12.058	12.381	11.878	12.695	12.177
乳酸	13.182	13.080	13.239	13.135	12.898	12.787	12.552	12.481	13.133	13.034
イタコン酸	14.134	13.377	14.199	13.451	13.752	13.020	13.321	12.651	14.061	13.325
ギ酸	14.170	13.925	14.259	14.019	—	—	13.355	13.171	14.105	13.878
グルタル酸	15.128	13.963	15.151	13.982	14.992	13.857	14.772	13.662	15.076	13.920
酢酸	15.576	15.262	15.584	15.264	15.518	15.186	15.412	15.090	15.543	15.233
フマル酸	16.141	14.535	16.612	14.963	14.225	12.944	12.798*	11.910*	15.850	14.374
レブリン酸	17.713	16.480	17.713	16.477	17.600	16.355	17.431	16.224	17.634	16.419
アジピン酸	18.484	16.464	18.499	16.473	18.319	16.301	18.078	16.126	18.408	16.410
プロピオン酸	18.796	18.186	18.789	18.180	18.718	18.087	18.597	17.999	18.739	18.136
iso-酪酸	22.041	21.117	22.017	21.101	21.915	20.983	21.779	20.880	21.958	21.052
n-酪酸	24.118	22.808	24.102	22.791	23.973	22.653	23.806	22.536	24.032	22.736
iso-吉草酸	29.225	27.162	29.189	27.140	29.015	26.958	28.792	26.794	29.107	27.060
n-吉草酸	36.510	32.700	36.475	32.689	36.258	32.450	35.997	32.274	36.329	32.578

*: 斜体数字はピーク形状が良くない

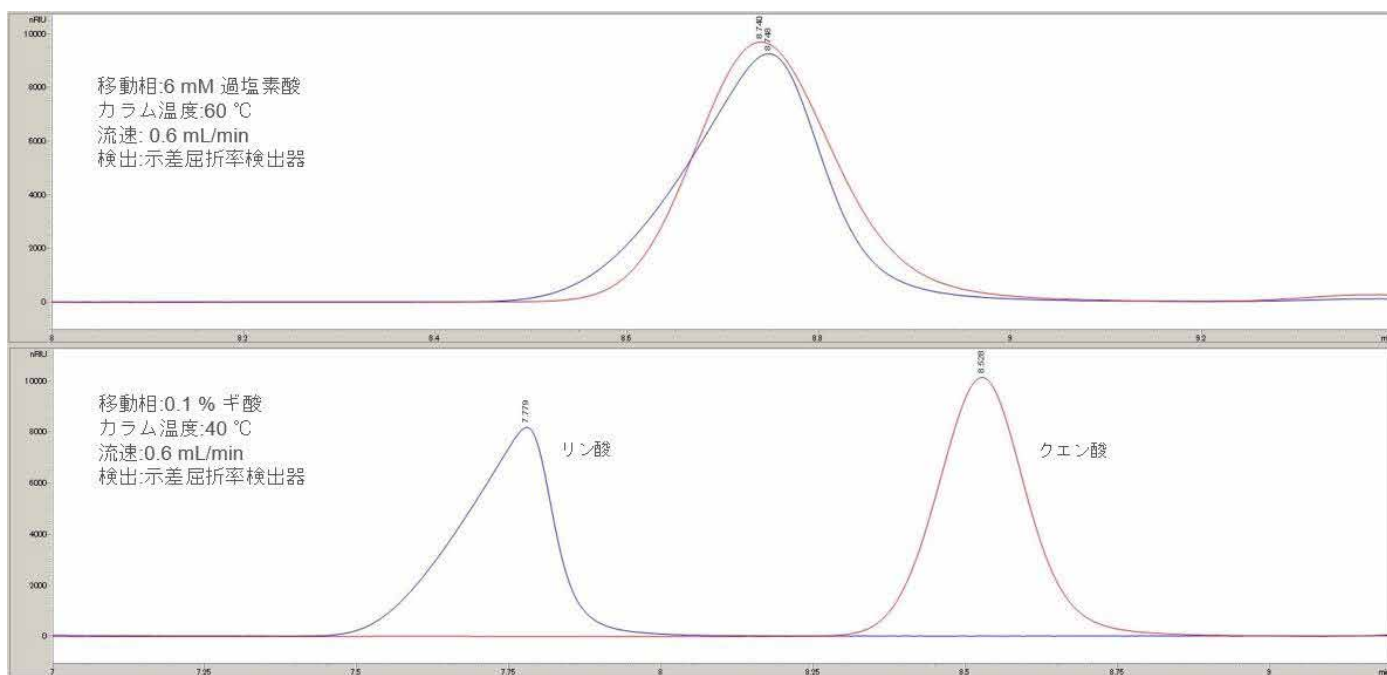


図 1. 分析条件の違いによるリン酸とクエン酸の保持の差

図 1 にリン酸とクエン酸の分離の比較を示します。もし、この 2 種類の酸を分析したい場合、移動相が 6 mM 過塩素酸、カラム温度 60 °C では分離困難ですが、移動相が 0.1 % ギ酸、カラム温度 40 °C では分離することが分かります (図 1 下部のクロマトグラム)。

結論

30 種類の酸を、イオン排除カラム Agilent Hi-Plex H を用いたさまざまな条件で分析し、保持挙動を確認しました。それぞれの条件での保持挙動をまとめることで、目的とする酸の分離の確認、分析条件の構築が容易になります。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE06763285

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, November 29, 2022

5994-5577JAJP

参考

1. 日本農林規格 醸造酢, JAS 0801, 1979
2. Anne Mark. Analysis of Organic Acids on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z Column. Agilent Technologies application note, publication number 5991-8985EN, 2018