

BTB - ポストカラム法による有機酸分析

著者

内藤 厚子
野田 莉帆
林 慶子

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

有機酸は食品分析においてしばしば分析対象となる化合物群であり、分析にはクロマトグラフィーの手法がよく用いられます。一般に短鎖や中鎖の脂肪酸（カルボン酸）は誘導体化することで GC/FID または GC/MS で測定することができます。一方 HPLC で分析を行う場合には、UV 検出では選択性が低く直接分析が困難なため、LC/MS で測定する方法があります^{1,2,3}。

本アプリケーションノートでは、BTB（プロモチモールブルー）- ポストカラム法を用いた HPLC による有機酸の分析を紹介します。選択性に優れたイオン排除カラムを分離に用い、BTB 溶液をポストカラムで添加して可視領域の波長（440 nm）で検出しました。pH 指示薬である BTB は酸性成分の溶出により吸収スペクトルが変化し、酸を選択的に測定できます。本法は食品のように複雑なマトリクスの試料でも夾雑物の影響を受けづらいという利点があります。

システム

Agilent 1260 InfinityLab LC システム

- クォータナリポンプ (G7111B, 移動相送液)
- クォータナリポンプ (G7111A, pH指示薬送液)
- バイアルサンブラ (G7129C)
- マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、または
可変波長検出器 (G7114B) ^(*)

^(*) 検出器は上記のいずれかを使用

Agilent OpenLab 2.7 ソフトウェア

図1のようにシステムを構築しました。システム構築に 35 μ L JetWeaver ミキサー (p/n G4220-68135)、Tee コネクタ (p/n 0100-0969)、背圧用キャピラリー (p/n 5022-2159) を使用し、0.17 mm 内径 ステンレス配管を用いて接続しました。

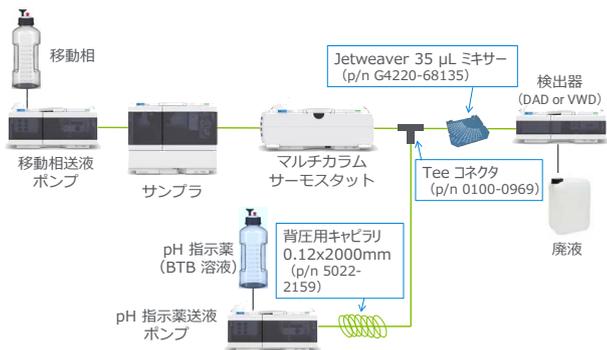


図 1. システム概要

試薬および試料調製

超純水 1000 mL につき、60 % 過塩素酸を 500 μ L 加えて混合し移動相として用いました (4.6 mM 過塩素酸)。

りん酸水素二ナトリウム・12 水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 5.37 g に超純水を加え 1 L にメスアップし、BTB 31 mg を加えてスターラーで混合して完全に溶解させ、pH 指示薬として用いました (0.05 mM BTB / 15 mM Na_2HPO_4)。

※ 使用試薬

- 過塩素酸 (60 %) : 富士フィルム和光純薬 (株)
製品コード 169-00725 (500 g), 和光一級
- りん酸水素二ナトリウム・12 水 : 富士フィルム和光純薬 (株)
製品コード 194-02831 (100 g), 試薬特級
- プロモチモールブルー : 富士フィルム和光純薬 (株)
製品コード 027-03052 (25 g), 試薬特級

有機酸標準試料 (ギ酸、酢酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、ピログルタミン酸) およびりん酸標準試料、および食品実試料は超純水で適宜希釈し測定に供しました。

測定条件

表 1. 測定条件

カラム	Hi-Plex H 7.7 \times 300 mm (Agilent, p/n PL1170-6830) 2 本連結 ^(**)
移動相	4.6 mM 過塩素酸
移動相流量	0.6 mL/min
pH 指示薬	0.05 mM BTB / 15 mM Na_2HPO_4
pH 指示薬流量	0.2 mL/min
カラム温度	60 $^{\circ}$ C
注入量	40 μ L
検出波長	440 nm (DAD の場合 バンド幅 10 nm)

^(**) マトリクスの多い実試料を測定する場合、ガードカラム (p/n PL1170-1830) の使用を推奨します。

結果

ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A DAD) による標準混合試料のクロマトグラムを図 2 に示します。有機酸 8 成分およびりん酸のピークの分離度はそれぞれ 1.5 以上であり良好な分離が得られました。

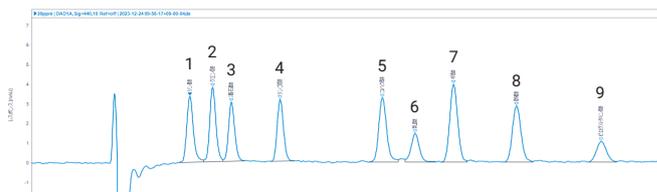


図 2. 標準試料のクロマトグラム (検出 : DAD、濃度 : 20 mg/L) ; 1; リン酸, 2; クエン酸, 3; 酒石酸, 4; リンゴ酸, 5; コハク酸, 6; 乳酸, 7; ギ酸, 8; 酢酸, 9; ピログルタミン酸

作成した分析条件の定量性検証のために、希釈系列を作成し分析を行いました。5 - 500 mg/L の濃度範囲において、すべての化合物で決定係数 0.999 以上の良好な直線性が確認されました。また 10 mg/L 濃度での感度、測定再現性を確認したところ、良好な感度と再現性が得られました (表 2)。

表 2. 10 mg/L 標準試料における S/N および再現性 (RSD%, n=6)

#	化合物	S/N	保持時間再現性[%]	面積再現性[%]
1	リン酸	29.6	0.139	2.421
2	クエン酸	33.0	0.130	2.011
3	酒石酸	27.3	0.138	2.744
4	リンゴ酸	27.5	0.134	3.001
5	コハク酸	29.4	0.145	2.787
6	乳酸	12.9	0.134	3.293
7	ギ酸	34.4	0.144	2.201
8	酢酸	25.7	0.147	1.891
9	ピログルタミン酸	9.3	0.141	4.355

このメソッドを食品実試料に適用しました。クロマトグラムを図 3 に示します。夾雑物ピークの影響を低減し有機酸のみを検出、定量することが可能でした。

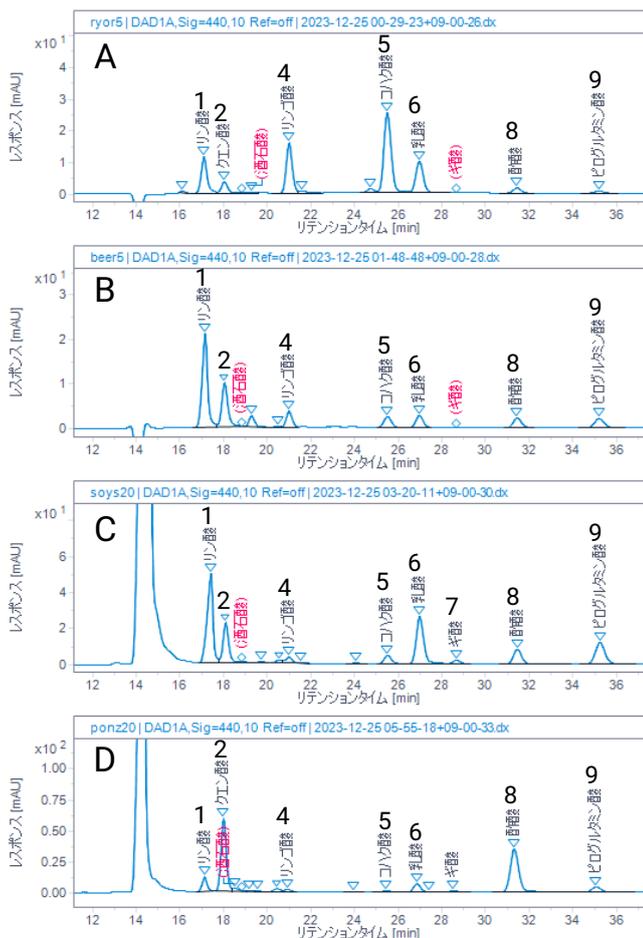


図 3. 食品試料のクロマトグラム, A; 料理酒 (5 倍希釈), B; ビール (5 倍希釈), C; 醤油 (20 倍希釈), D; ポン酢 (20 倍希釈), 1-9; 図 2 と同様

また、同様の測定を可変波長検出器 (G7114B VWD) でも行ったところ、DAD 検出と同様のクロマトグラムが得られました (図 4)。合わせて、測定したすべての化合物で良好な直線性が得られました。

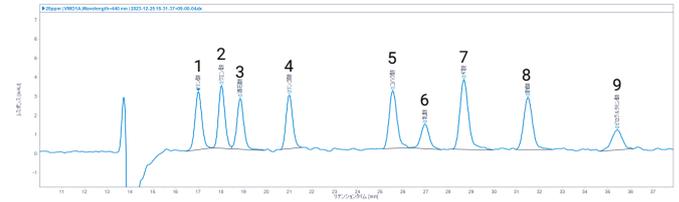


図 4. 標準試料のクロマトグラム (検出: VWD、濃度: 20 mg/L), 1-9; 図 2 と同様

まとめ

有機酸 8 成分、および分析対象となることが多いリン酸を加えた計 9 成分の酸について、BTB - ポストカラム法による分析を行い、食品試料に適用しました。本法は有機酸を選択的に検出できるため、UV 直接検出法と比較し複雑なマトリクスの試料にも適用することができます。また、ダイオードアレイ検出器 (DAD)、可変波長検出器 (VWD) のいずれの検出器においても測定が可能でした。DAD は多波長検出や UV スペクトル採取が可能であり、有機酸分析のみならずマルチメソッド分析等の幅広い用途に使用することができます。一方で費用投資を抑え VWD を用いることもできます。

今回測定に用いたイオン排除カラムは、短鎖～中鎖の脂肪酸 (カルボン酸) の分離に適しており、BTB 溶液を用いたポストカラム法と組み合わせることで用いることができます。マトリクスピークとの分離改善を試みる場合、イオン排除カラムの使用可能圧力 (50 bar 以下)、使用可能温度 (60 °C 以下)、使用可能有機溶媒組成 (アルコール 5 % 以下、アセトニトリル 30 % 以下) の範囲内で、分離を検討することも可能です⁴⁾。

参考

1. イオン排除-LC/MS による有機酸の分析 Agilent Technologies application note, publication number LC-MS-201611HK-001, 2016
2. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ による有機酸の分析 Agilent Technologies application note, publication number 5994-5348JAJ, 2022
3. Analysis of Organic Acids on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z Column. Agilent Technologies application note, publication number 5991-8985EN, 2018
4. イオン排除カラムを用いた有機酸の保持挙動確認 Agilent Technologies application note, publication number 5994-5577JAJ, 2022

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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いません。
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。

DE36162846

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, March 13, 2024
5994-7257JAJP

