SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ　Nexera™有機酸分析システム

Nexera有機酸分析システムとその応用

田邊 彩乃、加藤 理英

ユーザーベネフィット

- ◆ 有機酸を選択性良く高感度に分析できます。
- ◆ 有機酸分析移動相試薬キットにより試薬調製の手間を省き、手軽に安定した分析が行えます。
- ◆ 各分野における短鎖脂肪酸、低級脂肪酸の分析にも応用することができます。

■はじめに

有機酸は親水性が高く、HPLCで一般的に用いられるODSカラムでは十分な保持を得ることが難しい化合物です。また検出面では、紫外可視吸光度検出において短波長域に吸収を持ちますが、夾雑成分による妨害を受けやすく、高感度かつ選択的に分析するためには、検出方法を工夫する必要があります。

Nexera有機酸分析システムは、イオン排除カラムを用いた分離とpH緩衝化-電気伝導度検出法を組み合わせたシステムです。イオン排除カラムは有機酸の解離状態に応じた分離が可能で、有機酸を効率よく分離することができます。pH緩衝化-電気伝導度検出法は、検出時にpH緩衝化試薬を加え、有機酸を解離状態にして高感度検出を行う方法です。夾雑成分の影響を抑え、有機酸を選択的に感度良く検出することができます。さらに、移動相とpH緩衝化試薬がセットになった有機酸分析移動相試薬キットを用いることで、スムーズに分析に取り掛かることができ、安定した分析が行えます。

本稿では、標準分析例、応用例およびリテンションインデックスをご紹介いたします。

■標準試料の分析

本システムの流路図を図1に示します。図2に、イオン排除カラム Shim-pack™ SCR-102Hを用いた有機酸標準試料28成分のクロマトグラムを、表1に分析条件を示します。なお表5、表6を除き、すべて表1の条件で分析を行いました。

イオン排除カラムでは、対象成分の分離や、夾雑成分との分離が不十分な場合、温度や移動相濃度を変更することによって分離を微調整することができます。詳細はリテンションインデックスの項をご参照ください。

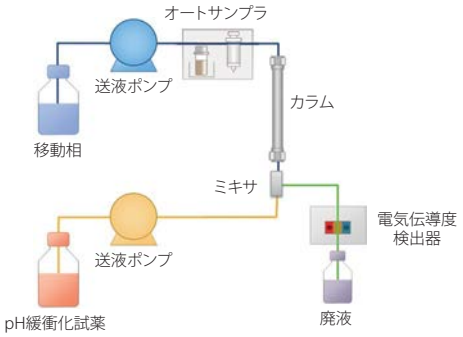
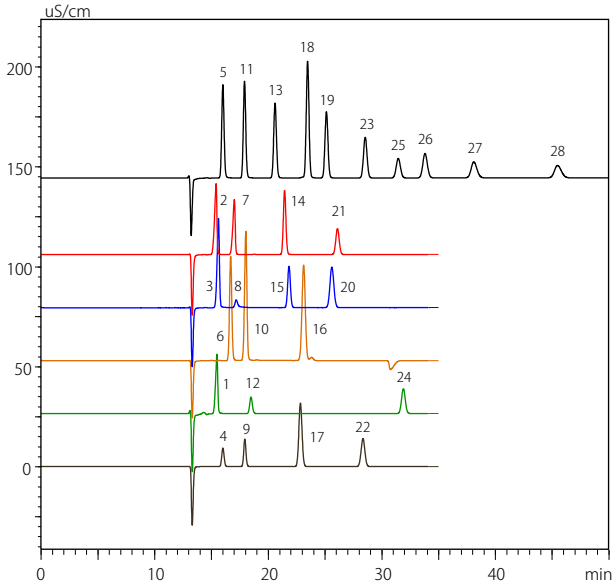


図 1　Nexera有機酸分析システムの流路図



1. りん酸	11. りんご酸	21. レブリン酸
2. マレイン酸	12. キナ酸	22. ピログルタミン酸
3. ケトグルタル酸	13. こはく酸	23. プロピオン酸
4. グルクロン酸	14. グリコール酸	24. 炭酸
5. くえん酸	15. 乳酸	25. イソ酪酸
6. 酒石酸	16. フマル酸	26. 酪酸
7. ピルビン酸	17. グルタル酸	27. イソ吉草酸
8. グルコン酸	18. ぎ酸	28. 吉草酸
9. グリオキシル酸	19. 酢酸	
10. マロン酸	20. アジピン酸	（各 500 mg/L）

図 2　有機酸標準試料28成分のクロマトグラム

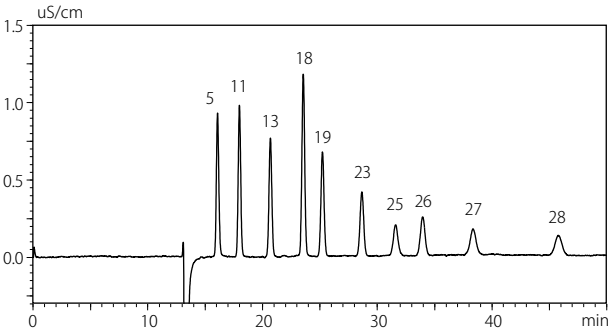
表 1　分析条件

System	: Nexera有機酸分析システム
Column	: Shim-pack SCR-102H (300 mm×8.0 mm I.D., 7 µm) *1 ×2
	: Guard column SCR-102H (50 mm × 6.0 mm I.D.) *2
Mobile Phase	: 5 mmol/L *p*-toluensulfonic acid
	(Reagents kit for Organic Acid Analysis System*3)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
pH Buffering Solution	: 5 mmol/L *p*-toluensulfonic acid, 20 mmol/L Bis-Tris *4, 0.1 mmol/L EDTA *5
	(Reagents kit for Organic Acid Analysis System*3)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Mixer	: Organic Acid Analysis Plumbing Kit (MR) *6
Temperature	: 45 ℃
Injection Vol.	: 20 µL
Vial	: SHIMADZU LabTotal・for LC 1.5 mL, Glass*7
Detection	: Conductivity

*1 P/N : 228-17893-91, *2 P/N : 228-17924-91, *3 P/N : 228-61465-91
*4 Bis-(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane
*5 Ethylenediaminetetraacetic acid
*6 P/N : 228-77532-41, *7 P/N : 228-15652-92

■ 再現性

有機酸標準試料10成分（各10 mg/L）のクロマトグラムを図3に、6回繰り返し分析における保持時間および面積値の再現性を表2に示します。



5. くえん酸
11. りんご酸
13. こはく酸
18. ぎ酸
19. 酢酸
23. プロピオン酸
25. イソ酪酸
26. 酪酸
27. イソ吉草酸
28. 吉草酸

図 3　有機酸標準試料10成分（各10 mg/L）のクロマトグラム

表 2　有機酸標準10成分の保持時間および面積値再現性
（10 mg/L, n=6）

	平均保持時間（min）	保持時間（%RSD）	平均面積値	面積値（%RSD）
くえん酸	16.10	0.013	13974	0.74
りんご酸	18.01	0.015	14940	0.68
こはく酸	20.70	0.011	13220	0.62
ぎ酸	23.57	0.015	20161	0.43
酢酸	25.24	0.013	12773	0.68
プロピオン酸	28.67	0.016	9167	0.43
イソ酪酸	31.61	0.027	5277	0.85
酪酸	33.97	0.017	7066	0.88
イソ吉草酸	38.36	0.030	5650	0.94
吉草酸	45.78	0.063	5172	0.90

■ 定量下限

図3のピーク高さとノイズ値を用いて算出した各成分のS/N比と、S/N=10になる濃度を定量下限値として、表3に示します。なお、この値は実測値を元に算出したものであり、参考値となります。

表 3　有機酸標準試料10成分（10 mg/L）における
S/N比および定量下限値

	S/N	定量下限（mg/L）
くえん酸	179	0.56
りんご酸	189	0.54
こはく酸	148	0.69
ぎ酸	226	0.44
酢酸	130	0.79
プロピオン酸	79.8	1.27
イソ酪酸	37.5	2.70
酪酸	48.1	2.09
イソ吉草酸	31.7	3.04
吉草酸	24.4	3.96

■ 検量線

有機酸標準試料10成分の5~1000 mg/Lにおける検量線および寄与率を表4および図4に示します。寄与率はいずれも0.9999以上と良好な直線性が得られました。

表 4　有機酸標準試料10成分の検量線濃度範囲および寄与率

	検量線濃度範囲（mg/L）	寄与率
くえん酸	5 - 1000	0.99997
りんご酸		0.99997
こはく酸		0.99993
ぎ酸		0.99998
酢酸		0.99998
プロピオン酸		0.99998
イソ酪酸		0.99999
酪酸		0.99999
イソ吉草酸		0.99999
吉草酸		0.99999

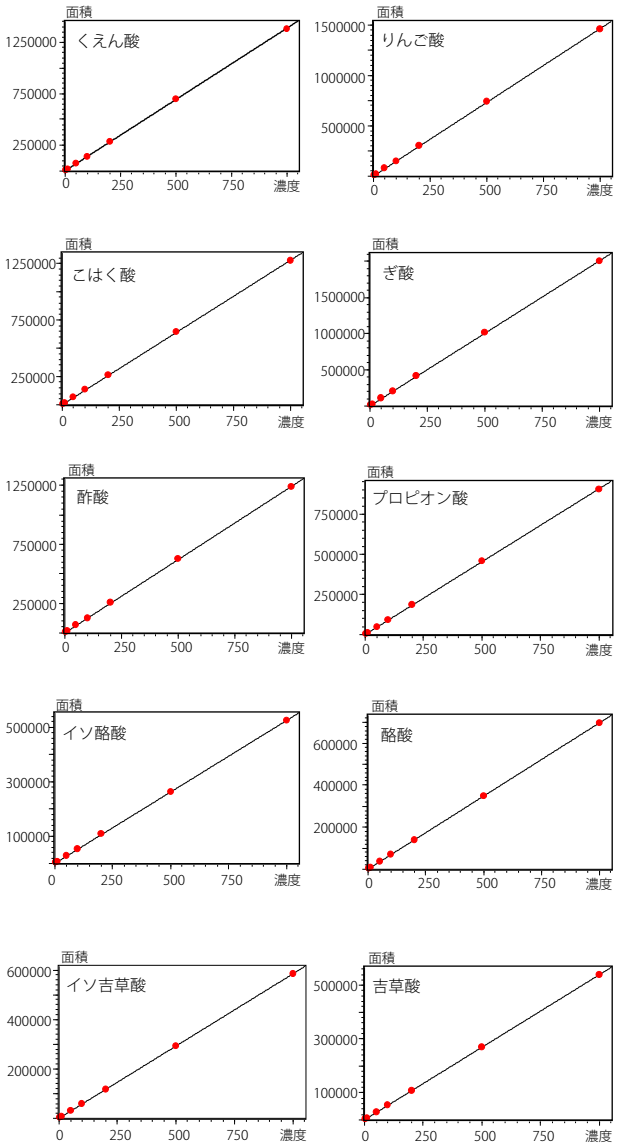
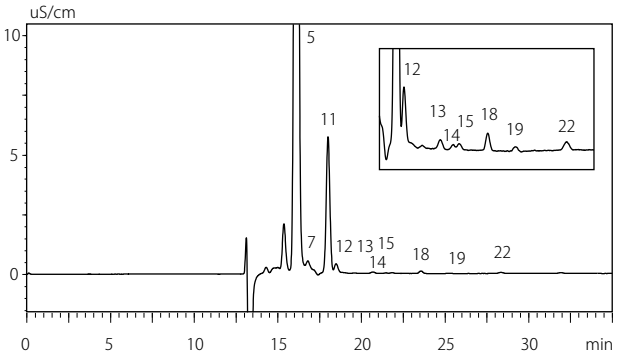


図 4　有機酸標準試料10成分の検量線

■応用例

・オレンジジュースの分析

オレンジジュース（果汁100 %）を超純水で10倍希釈し、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図5にクロマトグラムを示します。

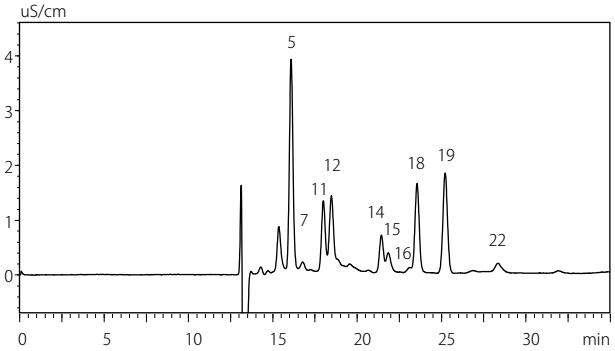


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
12. キナ酸
13. こはく酸
14. グリコール酸
15. 乳酸
18. ぎ酸
19. 酢酸
22. ピログルタミン酸

図5　オレンジジュースのクロマトグラム

・コーヒーの分析

コーヒー（アラビカ種）を超純水で5倍希釈し、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図7にクロマトグラムを示します。

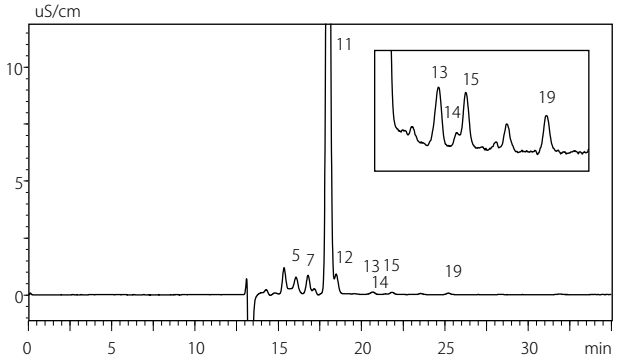


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
12. キナ酸
14. グリコール酸
15. 乳酸
16. フマル酸
18. ぎ酸
19. 酢酸
22. ピログルタミン酸

図7　コーヒーのクロマトグラム

・りんごジュースの分析

りんごジュース（果汁100 %）を超純水で10倍希釈し、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図6にクロマトグラムを示します

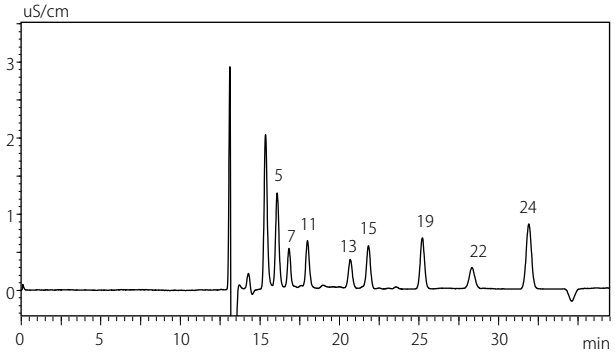


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
12. キナ酸
13. こはく酸
14. グリコール酸
15. 乳酸
19. 酢酸

図6　りんごジュースのクロマトグラム

・ビールの分析

缶ビールを振り混ぜて炭酸を除き、超純水で10倍希釈した後、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過し、分析を行いました。図8にクロマトグラムを示します

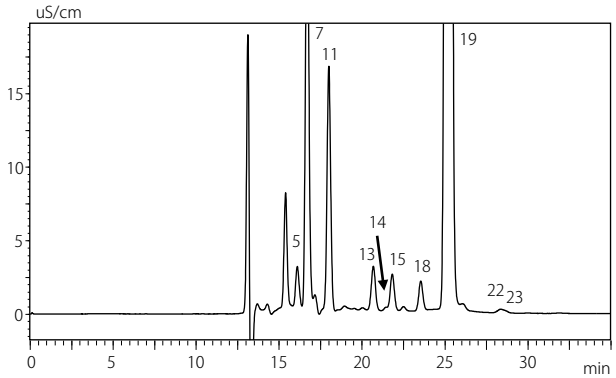


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
13. こはく酸
15. 乳酸
19. 酢酸
22. ピログルタミン酸
24. 炭酸

図8　ビールのクロマトグラム

・バルサミコ酢の分析

バルサミコ酢を超純水で10倍希釈し、0.45 µmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図9にクロマトグラムを示します。

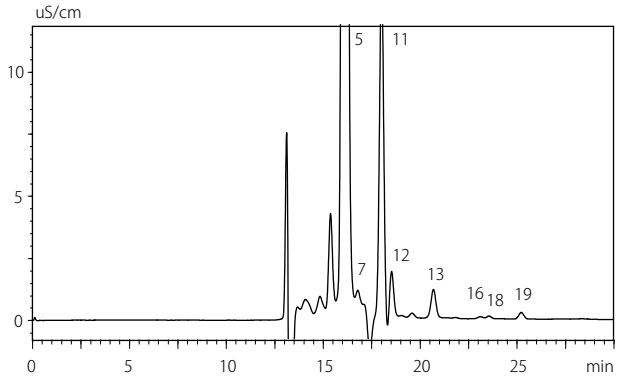


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
13. こはく酸
14. グリコール酸
15. 乳酸
18. ぎ酸
19. 酢酸
22. ピログルタミン酸
23. プロピオン酸

図 9　バルサミコ酢のクロマトグラム

・ブルーベリーの分析

冷凍ブルーベリー8.6 gを軽くつぶした後、超純水5 mLを加えて2分間ホモジナイズを行いました。その後、遠心分離（14000 rpm、5分間）を行い、上清を0.45 µmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図11にクロマトグラムを示します。

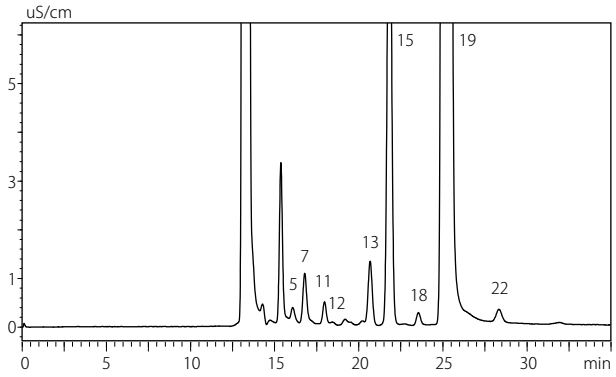


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
12. キナ酸
13. こはく酸
16. フマル酸
18. ぎ酸
19. 酢酸

図 11　ブルーベリー抽出液のクロマトグラム

・チリペッパーソースの分析

チリペッパーソースを超純水で10倍希釈した後、0.45 µmのメンブランフィルタでろ過しました。図10にクロマトグラムを示します。

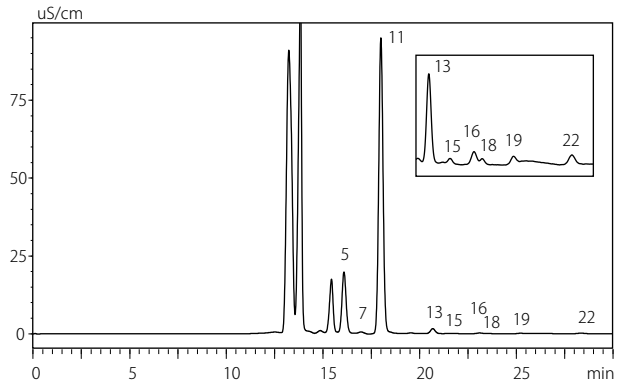


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
12. キナ酸
13. こはく酸
15. 乳酸
18. ぎ酸
19. 酢酸
22. ピログルタミン酸

図 10　チリペッパーソースのクロマトグラム

・ほうれん草の分析

冷凍ほうれん草3.4 gを細かくカットした後、超純水5 mLを加えて2分間ホモジナイズを行いました。その後、遠心分離（14000 rpm、5分間）を行い、上清を0.45 µmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図12にクロマトグラムを示します。

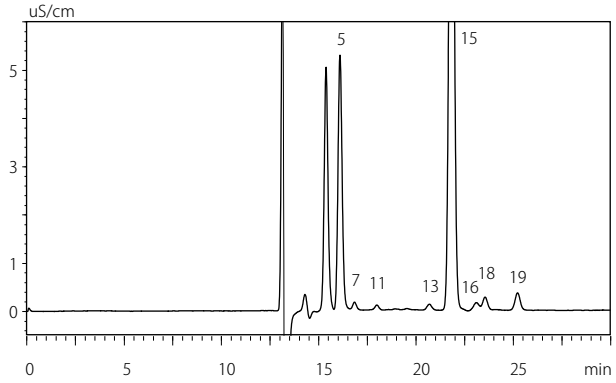


5. くえん酸
7. ピルビン酸
11. りんご酸
13. こはく酸
15. 乳酸
16. フマル酸
18. ぎ酸
19. 酢酸
22. ピログルタミン酸

図 12　ほうれん草抽出液のクロマトグラム

・ヨーグルトの分析

ヨーグルト（牛乳）0.5 gを超純水で10 mLに定容し、限外ろ過カートリッジ（分画分子量10000）で除たんぱくした後、分析を行いました。図13にクロマトグラムを示します。

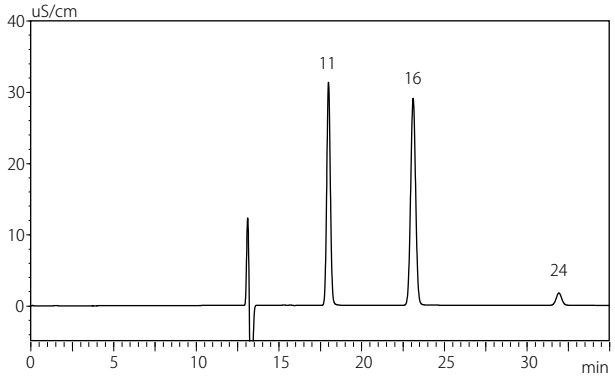


5.	くえん酸	15.	乳酸
7.	ピルビン酸	16.	フマル酸
11.	りんご酸	18.	ぎ酸
13.	こはく酸	19.	酢酸

図 13　ヨーグルトのクロマトグラム

・入浴剤の分析

入浴剤1 gを超純水で10 mLに定容し、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過し超純水で50倍希釈した後、分析を行いました。図15にクロマトグラムを示します。

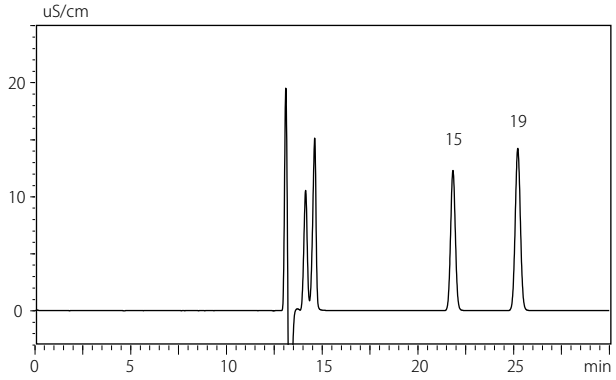


11. りんご酸　16. フマル酸　24. 炭酸

図 15　入浴剤のクロマトグラム

・めっき液Aの分析

めっき液Aを超純水で100倍希釈し、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図14にクロマトグラムを示します。

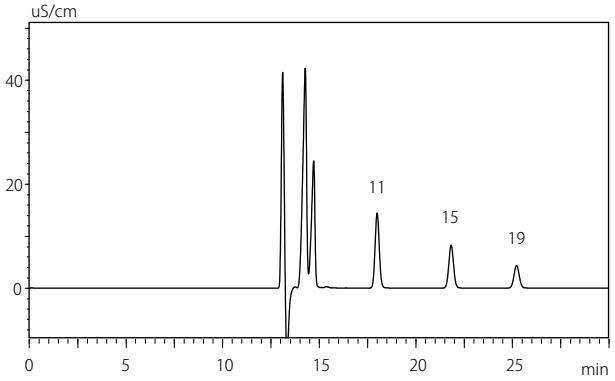


15. 乳酸　19. 酢酸

図 14　めっき液Aのクロマトグラム

・めっき液Bの分析

めっき液Bを超純水で100倍希釈し、0.45 μmのメンブランフィルタでろ過した後、分析を行いました。図16にクロマトグラムを示します。



11. りんご酸　15. 乳酸　19. 酢酸

図 16　めっき液Bのクロマトグラム

■リテンションインデックス ＜有機酸分析移動相試薬キット：5 mmol/L *p*-トルエンスルホン酸＞

35、40、45、50 ℃の4種類の温度における有機酸標準試料28成分の保持時間の目安を表5に示します。

表 5　有機酸標準試料28成分の各温度における保持時間の目安
（有機酸分析移動相試薬キットの場合、min）

	成分名	35 ℃	40 ℃	45 ℃	50 ℃
1	りん酸	15.32	15.40	15.50	15.59
2	マレイン酸	15.54	15.48	15.43	15.38
3	ケトグルタル酸	15.79	15.71	15.64	15.57
4	グルクロン酸	16.02	16.03	16.03	16.02
5	くえん酸	16.26	16.18	16.12	16.04
6	酒石酸	16.86	16.79	16.71	16.64
7	ピルビン酸	17.10	17.07	17.03	17.00
8	グルコン酸	17.22	17.21	17.20	17.19
9	グリオキシル酸	17.99	17.98	17.96	17.93
10	マロン酸	18.25	18.15	18.05	17.95
11	りんご酸	18.23	18.11	18.02	17.92
12	キナ酸	18.63	18.56	18.50	18.43
13	こはく酸	21.16	20.92	20.71	20.50
14	グリコール酸	21.66	21.56	21.46	21.36
15	乳酸	21.94	21.90	21.85	21.80
16	フマル酸	24.35	23.72	23.14	22.62
17	グルタル酸	23.79	23.11	22.85	22.43
18	ぎ酸	23.83	23.69	23.58	23.45
19	酢酸	25.55	25.38	25.24	25.06
20	アジピン酸	27.15	26.35	25.62	24.94
21	レブリン酸	27.10	26.60	26.11	25.65
22	ピログルタミン酸	29.61	28.96	28.36	27.82
23	プロピオン酸	29.20	28.91	28.65	28.36
24	炭酸	31.78	31.85	31.92	31.90
25	イソ酪酸	32.28	31.91	31.56	31.15
26	n-酪酸	34.97	34.43	33.91	33.36
27	イソ吉草酸	39.71	38.96	38.21	37.41
28	n-吉草酸	48.46	47.01	45.59	44.16

■リテンションインデックス ＜有機酸分析移動相試薬キットを2倍希釈：2.5 mmol/L *p*-トルエンスルホン酸＞

有機酸分析移動相試薬キットを超純水で2倍希釈し、酸濃度を低くした場合の35、45 ℃における保持時間の目安を表6に示します。

表 6　有機酸標準試料28成分の各温度における保持時間の目安
（有機酸分析移動相試薬キット 2倍希釈の場合、min）

	成分名	35 ℃	45 ℃
1	りん酸	14.66	14.79
2	マレイン酸	14.70	14.61
3	ケトグルタル酸	14.96	14.84
4	グルクロン酸	15.73	15.74
5	くえん酸	15.86	15.73
6	酒石酸	16.35	16.22
7	ピルビン酸	16.10	16.00
8	グルコン酸	17.06	17.04
9	グリオキシル酸	17.59	17.55
10	マロン酸	17.43	17.26
11	りんご酸	17.87	17.68
12	キナ酸	18.31	18.19
13	こはく酸	21.03	20.60
14	グリコール酸	21.40	21.21
15	乳酸	21.69	21.61
16	フマル酸	22.92	21.90
17	グルタル酸	23.70	22.77
18	ぎ酸	23.44	23.22
19	酢酸	25.49	25.19
20	アジピン酸	27.06	25.54
21	レブリン酸	27.05	26.06
22	ピログルタミン酸	28.231	27.17
23	プロピオン酸	29.147	28.61
24	炭酸	31.7	31.92
25	イソ酪酸	32.24	31.52
26	n-酪酸	34.92	33.87
27	イソ吉草酸	39.68	38.17
28	n-吉草酸	48.47	45.56

■まとめ

本稿では、Nexera有機酸分析システムの標準分析例、応用例およびリテンションインデックスをご紹介しました。有機酸分析移動相試薬キットを用いることにより、手軽に再現性の良い分析を行うことができます。また今回の食品および化学分野に加え、環境、医薬品、ライフサイエンスなど幅広い分野での活用も期待されます。

Nexera、Shim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00171-JP　初版発行：2021年 9月

島津コールセンター　0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021