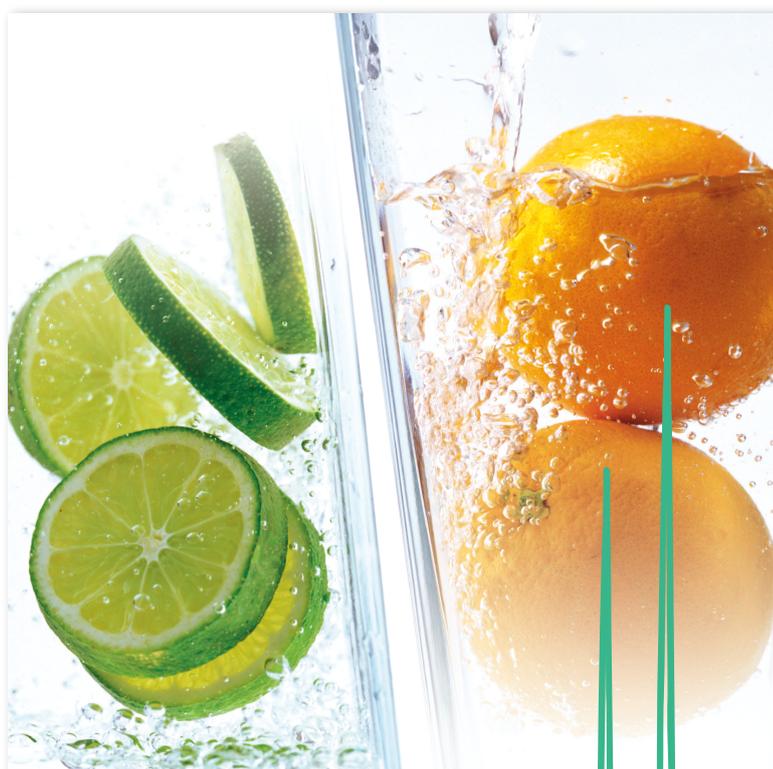


# 島津高速液体クロマトグラフ **有機酸分析システム**

SHIMADZU HPLC ORGANIC ACID ANALYSIS SYSTEM

**応用データ集**  
APPLICATION DATA BOOK





# 島津高速液体クロマトグラフ 有機酸分析システム 応用データ集

## 目 次

1. 有機酸分析システムの概要	1
2. ポストカラムpH緩衝化法の原理	2
3. 標準品分離例	3
4. 有機酸の溶出時間	6
5. 応用例	7
5-1 食品分野	7
5-2 医薬品分野	12
5-3 環境分野	14



# 1

## 有機酸分析システムの概要

有機酸をUV検出器により検出する場合、200～210 nmにおけるカルボキシル基の吸収を利用しますが、このような短波長域では夾雑成分の影響を受けやすくなり、試料によっては分析が困難な場合があります。

一方、電気伝導度検出器はイオン性物質を選択的に高感度に検出できるため、UV検出器に比べて夾雑成分の妨害は少なくなります。有機酸分析で用いられるイオン排除クロマトグラフィーでは酸性移動相によりバックグラウンド電気伝導度が高くなり、さらに有機酸の解離平衡が非解離側に片寄ってしまうため、そのままでは高感度検出が困難になります。

島津高速液体クロマトグラフ「有機酸分析システム」は、イオン排除クロマトグラフィー用カラムからの溶出液とpH緩衝剤溶液を混合し、pHを中性付近として電気伝導度検出器で検出するポストカラムpH緩衝化システムです。有機酸は解離状態で検出されますので、大幅に感度が向上します。(特許No.2017498)

本システムの流路を図1に示します。分析カラムには、イオン排除クロマトグラフィー用カラム「Shim-pack SCR-102H」を用い、p-トルエンスルホン酸水溶液を移動相にして、各有機酸を分離します。pH緩衝化にはビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン [Bis-Tris,  $pK_a=6.45(25^\circ\text{C})$ ] を緩衝剤として用います。混合部には本システム専用の「配管部品J」を用います。

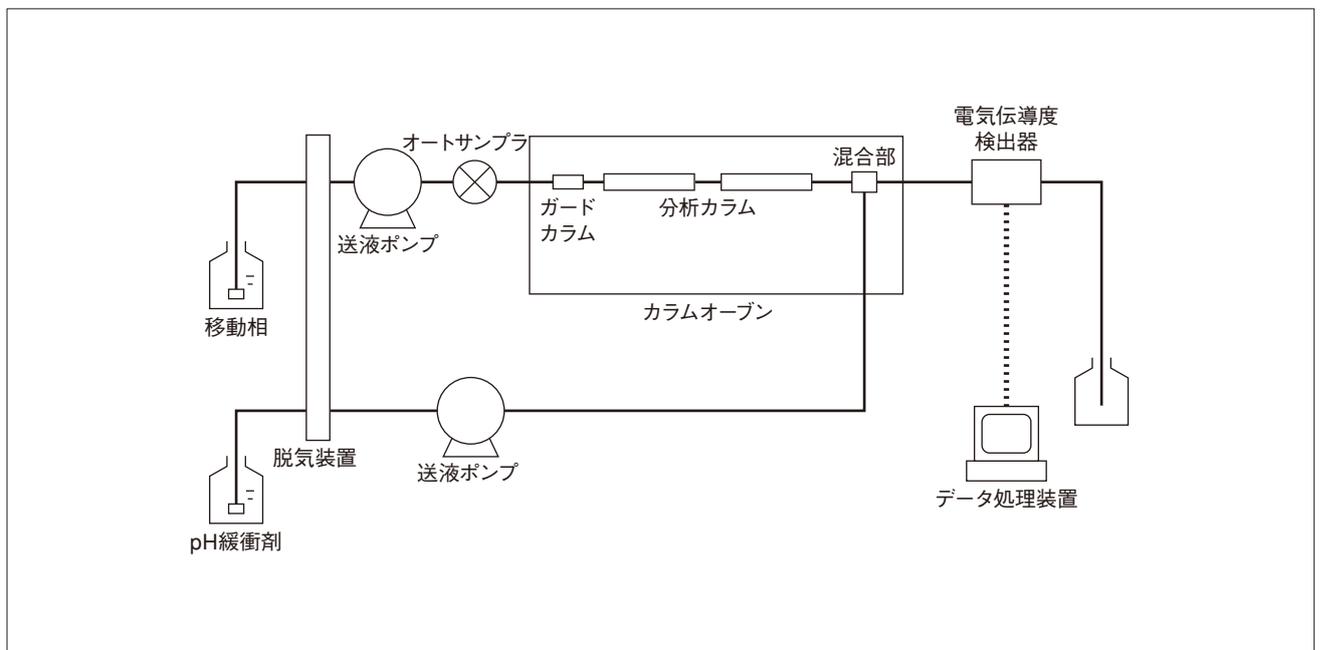


図1 流路図

本システムの標準分析条件は、表1の通りです。

表1 標準分析条件

〈分離条件〉	〈検出条件〉
カラム：Shim-pack SCR-102H (300 mmL.×8 mmI.D.) 2本直接続 (試料によっては1本でも可能) ただし ガードカラム SCR-102H (50 mmL.×6 mmI.D.) 付き	試薬：5 mmol/L p-トルエンスルホン酸 および100 μmol/L EDTAを含む 20 mmol/L Bis-tris水溶液
移動相：5 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液	流量：0.8 mL/min
流量：0.8 mL/min	検出器：電気伝導度 polarity：+
温度：40 °C (もしくは45 °C)	セル温度は自動設定

# 2

## ポストカラムpH緩衝化法の原理

電気伝導度検出法は分析対象成分が引き起こすイオン量の変化を測定する検出法です。本検出法は有機酸のようなイオン性物質を選択的に検出する上で好適な方法ですが、有機酸の分離に用いられるイオン排除クロマトグラフィーに直接応用する場合にはあまり利点が生まれません。その理由は、移動相に強酸水溶液を用いることから、有機酸の解離が抑制されて検出感度が得られず、検出の直線性も限定された範囲にとどまるためです。感度を向上させるためには、カラム溶出液を中和して有機酸を解離させる方法が考えられますが、単に中和するだけでは水素イオン濃度および水酸イオン濃度の変化を伴うため、直線性の向上には至りません。したがって、pHを緩衝することも必要となります。

いま、完全解離の強酸 (HA) の水溶液を移動相に用いたイオン排除クロマトグラフィーにおいて、塩基 (B) を含む緩衝液をカラム溶出液に混合してpHを緩衝する方法を考えてみましょう。そのときの有機酸 (HO) に対する検出器の応答量 (S) は次式によって示されます。

$$S=[O^-]\lambda_O+\Delta[A^-]\lambda_A+\Delta[BH^+]\lambda_B+\Delta[H^+]\lambda_H+\Delta[OH^-]\lambda_{OH} \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $\lambda_O$ ,  $\lambda_A$ ,  $\lambda_B$ ,  $\lambda_H$ , および  $\lambda_{OH}$  は、各々、 $O^-$ ,  $A^-$ ,  $BH^+$ ,  $H^+$  および  $OH^-$  のイオン当量電気伝導度です。これらのうち、 $\Delta[A^-]$  はイオン排除クロマトグラフィーでは無視できます。

もし、混合液のpHがHOの $pK_a$ より十分に大きければHOは完全に解離すると見なせるので、Bの緩衝容量が最大になる条件下、すなわち、Bの $pK_a$ に等しい値のpHで混合液を緩衝する条件下 (このとき、Bの濃度はHAの濃度の2倍となる) での各イオンの濃度変化は次のように表せます。

$$\left. \begin{aligned} [O^-] &= C_0 & \Delta[BH^+] &= C_0 & \Delta[H^+] &= \frac{(C_A + C_0)}{(C_A - C_0)} K_B - K_B = \frac{2C_0}{(C_A - C_0)} K_B \\ \Delta[OH^-] &= \frac{(C_A - C_0)}{(C_A + C_0)} \cdot \frac{K_W}{K_B} - \frac{K_W}{K_B} = - \frac{2C_0}{(C_A + C_0)} \cdot \frac{K_W}{K_B} \end{aligned} \right\} \dots\dots\dots (2)$$

ここで、 $C_0$  および  $C_A$  は、各々、HO および HA の濃度、 $K_B$  は B の酸解離係数、 $K_W$  は水のイオン積です。これらの式を式(1)に代入すると、応答量は次のように書き改められます。

$$S=C_0(\lambda_O+\lambda_B) + \frac{2C_0}{(C_A^2-C_0^2)} [(C_A+C_0)K_B\lambda_H - (C_A-C_0)\frac{K_W}{K_B}\lambda_{OH}] \dots\dots\dots (3)$$

もし、 $C_0 \ll C_A$  であれば、 $K_B$  が以下の式を満たすとき、

$$pK_B = \frac{1}{2} (pK_W + \log \lambda_H - \log \lambda_{OH}) \dots\dots\dots (4)$$

式(3)の第2項の値はゼロとなり、式(3)は次式のような簡単な式に書き換えられます。

$$S=C_0(\lambda_O+\lambda_B) \dots\dots\dots (5)$$

有機酸が充分低濃度であるとき、応答量は有機酸の一次関数とみなすことができ、直線性が成立します。なお、式(4)を満たし、式(5)が成立する $pK_B$ は、 $\lambda_H = 349.8 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{eq}^{-1}$ ,  $\lambda_{OH} = 198.3 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{eq}^{-1}$ ,  $pK_W = 14$  を式(4)に代入して7.12となります。

# 3

## 標準品分離例

図2に分析カラム2本による、有機酸11成分およびりん酸標準溶液のクロマトグラムを示します。一般に食品試料の場合、これら有機酸が分析対象となります。

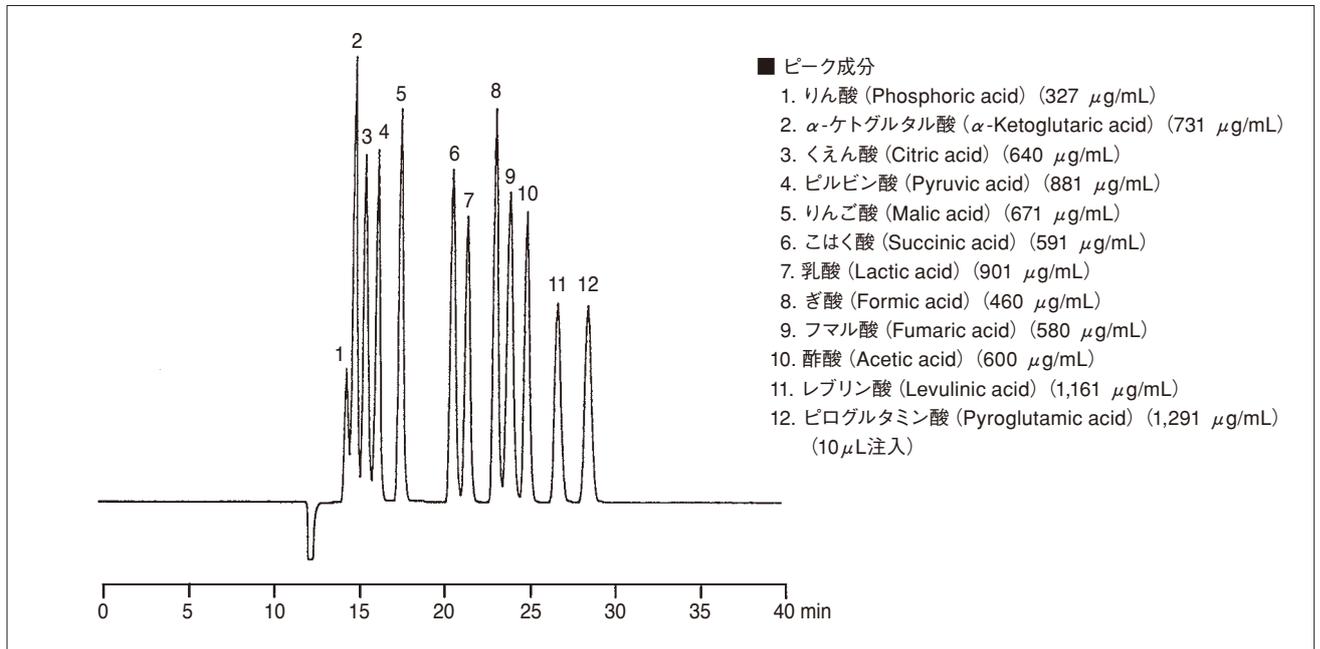


図2 有機酸11成分およびりん酸標準溶液のクロマトグラム

図3に分析カラム1本での有機酸9成分およびりん酸標準溶液のクロマトグラムを示します。試料によっては、分析カラム1本での分析も可能ですが、分離が困難になる成分がありますので注意が必要です。なお、分析カラム1本で、こはく酸と乳酸の分離を改善する場合、カラム温度を45℃に設定すると効果的です。

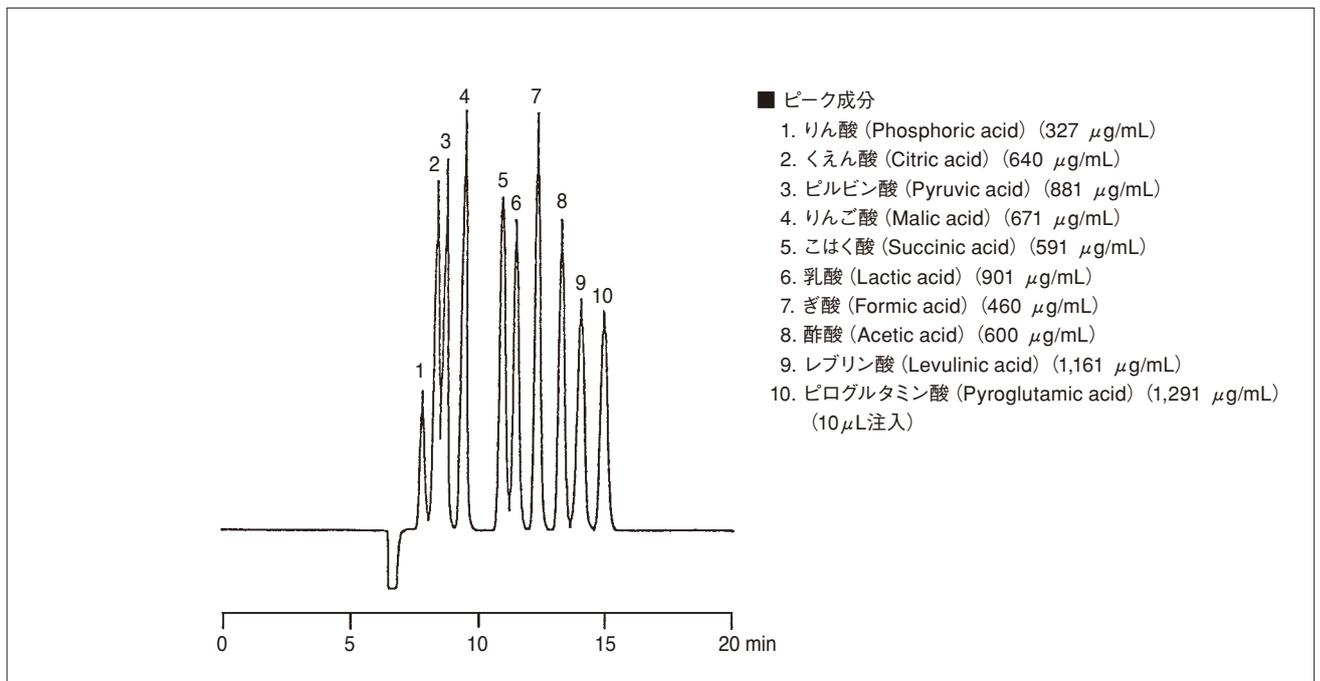


図3 有機酸9成分およびりん酸標準溶液のクロマトグラム

### 3 標準品分離例

サイレージなどの菌体発酵試料では、炭素数1~5の脂肪族カルボン酸が含まれますが、それらの成分の分析では1本のカラムを用いた図4の分析条件が便利です。

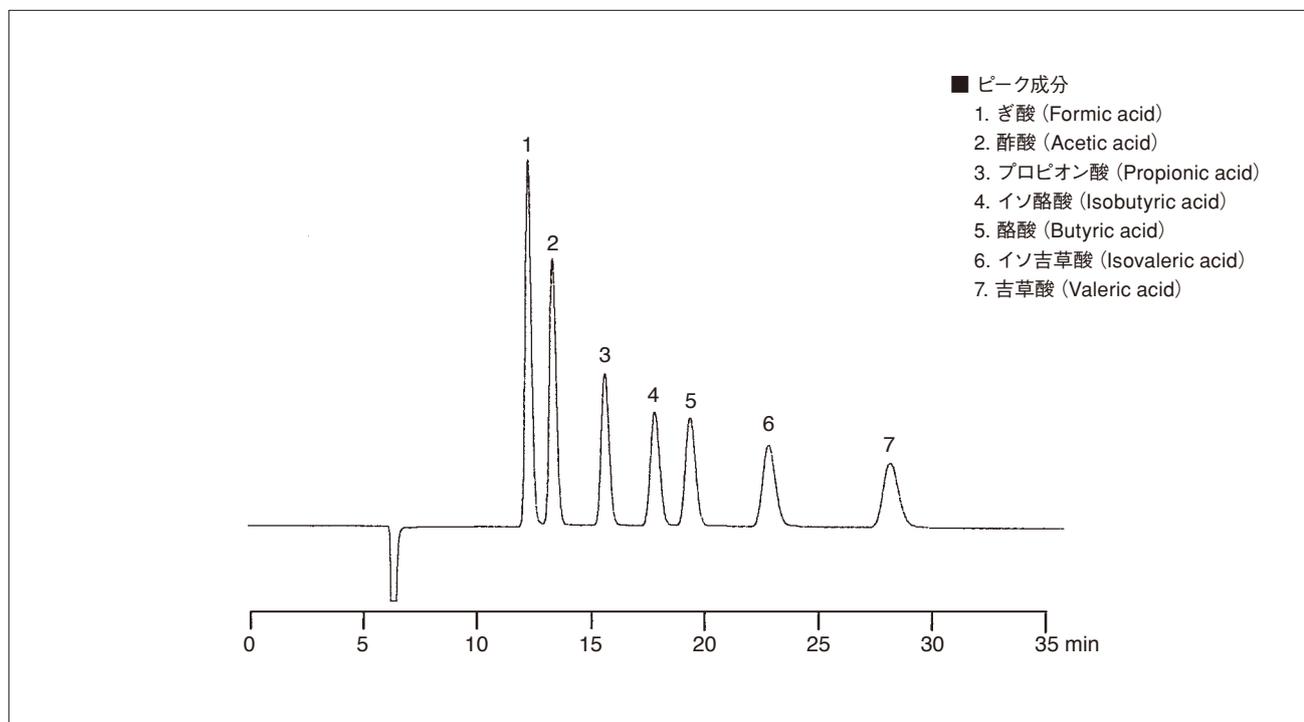


図4 脂肪族カルボン酸7成分標準溶液のクロマトグラム

脂肪族ジカルボン酸の場合も同様に1本のカラムで分析するのが適当です。ただし、しゅう酸はシステムピークと重なるため、定量はできません。

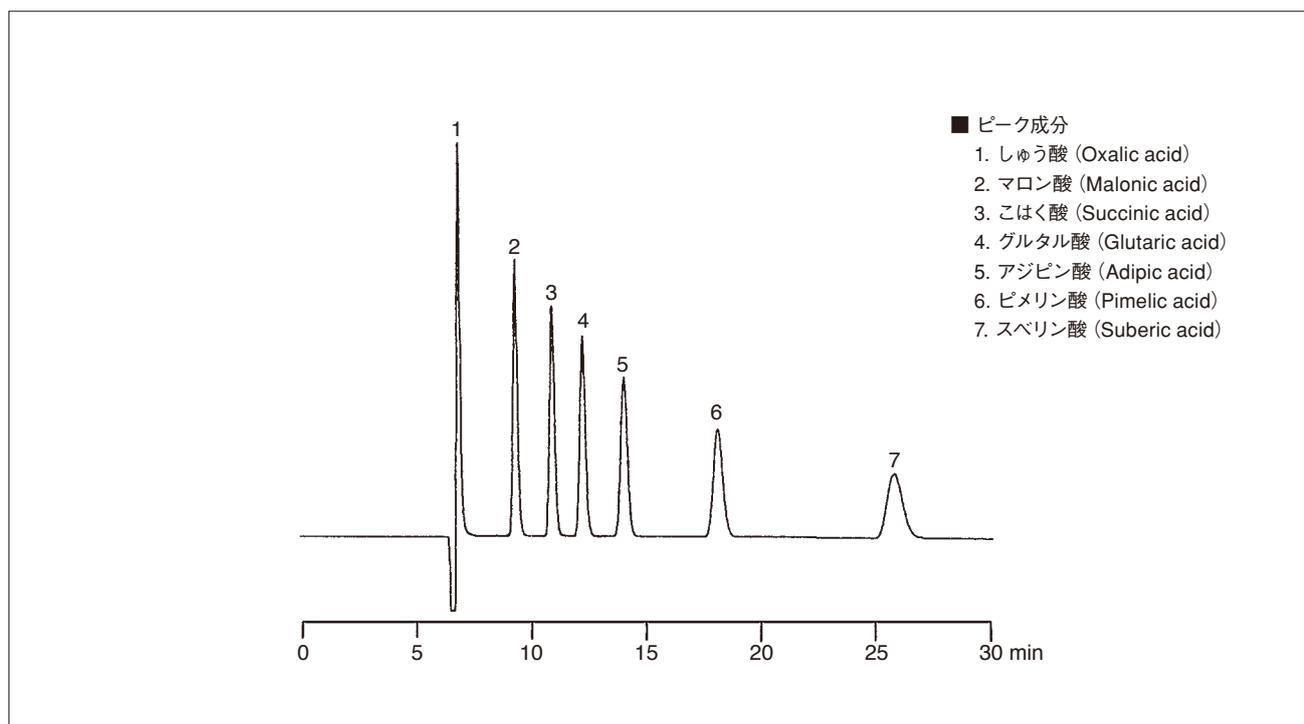


図5 脂肪族ジカルボン酸5成分標準溶液のクロマトグラム

本システムは有機酸の他に、炭酸やほう酸などの弱酸の分析にも使用できます。その場合、緩衝剤にはBis-Trisの代わりに、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) あるいはエタノールアミンを用います。

図6, 18, 19, 22は, 表2の条件で分析しています。

表2 弱酸用分析条件

〈分離条件〉	〈検出条件〉
カラム：Shim-pack SCR-102H (300 mmL×8 mmI.D.) ガードカラム SCR-102H (50 mmL×6 mmI.D.) 付き	試薬：2 mmol/L p-トルエンスルホン酸および 100 μmol/L EDTAを含む
移動相：2 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液	8 mmol/L エタノールアミン水溶液
流量：0.8 mL/min	流量：0.8 mL/min
温度：45 °C	検出器：電気伝導度 polarity：+ セル温度は自動設定

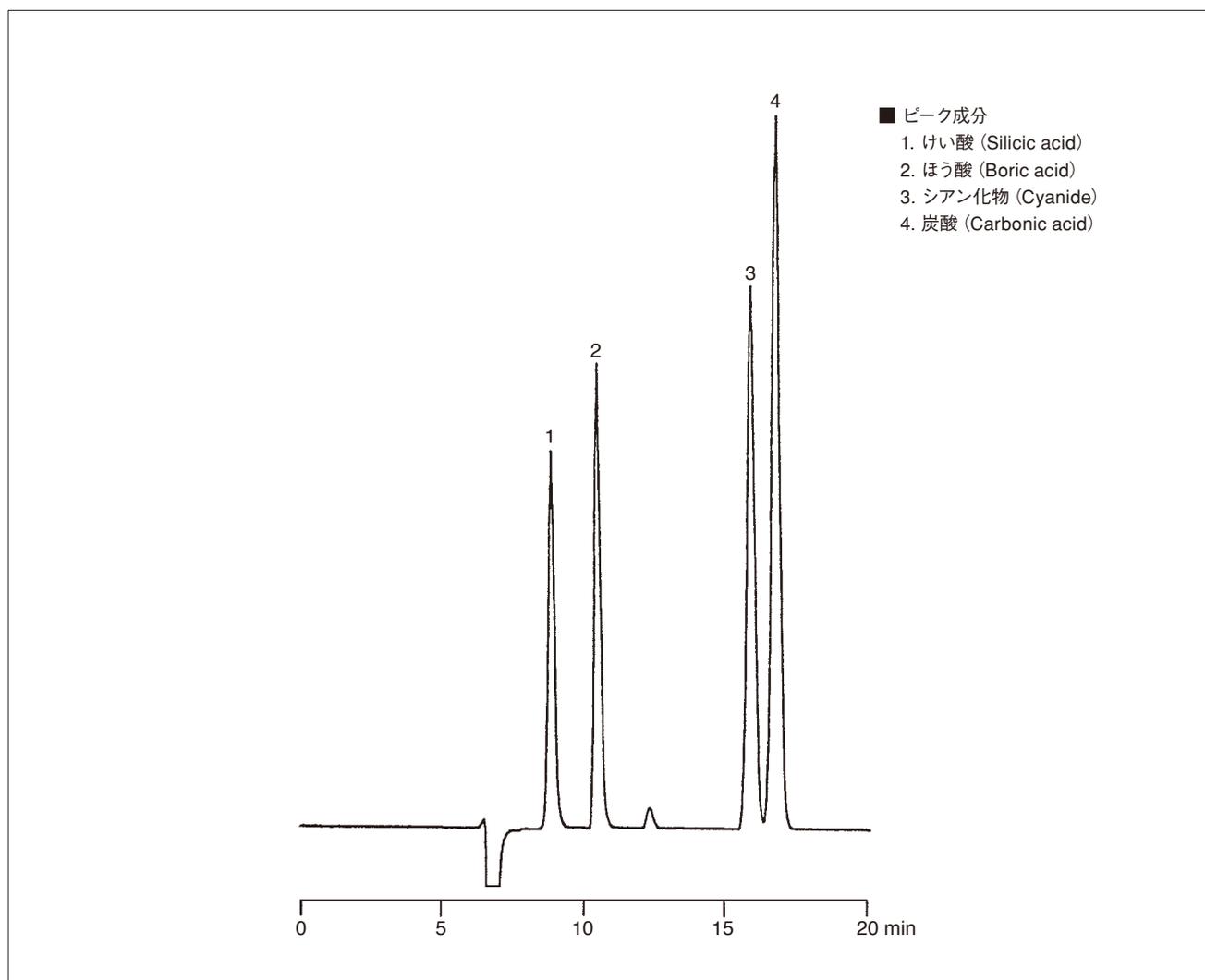


図6 弱酸4成分標準溶液のクロマトグラム

## 4

## 有機酸の溶出時間

本システムによる有機酸各成分の溶出時間を表3に示します。分離の状態は移動相の酸濃度および温度に依存しますので、対象成分の分離が不十分な場合は、まず温度（30℃～60℃）、そして酸濃度（1mmol/L～10mmol/L）を検討します。ただし、表内のすべての成分を一斉に分離することは困難です。

表3 有機酸の保持時間\*（Shim-pack SCR-102H, 1本）

Organic acids	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C
System peak	6.73	6.73	6.73	6.73
しゅう酸（Oxalic acid）	6.94	6.94	6.93	6.92
オキサロ酢酸（Oxaloacetic acid）	7.48	7.46	7.43	7.41
マレイン酸（Maleic acid）	7.94	7.91	7.88	7.86
α-ケトグルタル酸（α-Ketoglutaric acid）	8.12	8.08	8.04	8.01
グルクロン酸（Glucuronic acid）	8.27	8.28	8.28	8.28
くえん酸（Citric acid）	8.43	8.40	8.36	8.33
酒石酸（Tartaric acid）	8.76	8.73	8.68	8.66
ピルビン酸（Pyruvic acid）	8.83	8.82	8.80	8.79
グルコン酸（Gluconic acid）	8.95	8.96	8.95	8.96
グリオキシル酸（Glyoxylic acid）	9.38	9.38	9.37	9.37
マロン酸（Malonic acid）	9.53	9.48	9.42	9.38
りんご酸（Malic acid）	9.56	9.51	9.44	9.40
シトラコン酸（Citraconic acid）	9.76	9.72	9.66	9.62
こはく酸（Succinic acid）	11.28	11.16	11.03	10.93
グリコール酸（Glycolic acid）	11.43	11.40	11.33	11.30
乳酸（Lactic acid）	11.68	11.66	11.62	11.59
イタコン酸（Itaconic acid）	12.13	11.97	11.79	11.64
ぎ酸（Formic acid）	12.63	12.58	12.50	12.45
グルタル酸（Glutaric acid）	12.92	12.64	12.36	12.14
フマル酸（Fumaric acid）	13.30	12.92	12.57	12.29
酢酸（Acetic acid）	13.66	13.60	13.50	13.41
レブリン酸（Levulinic acid）	14.83	14.55	14.25	13.99
アジピン酸（Adipic acid）	15.10	14.62	14.16	13.78
ピログルタミン酸（Pyroglutamic acid）	15.94	15.60	15.27	14.97
プロピオン酸（Propionic acid）	15.94	15.81	15.63	15.46
ピメリン酸（Pimelic acid）	20.28	19.24	18.28	17.48
イソ酪酸（Isobutyric acid）	18.11	17.91	17.64	17.40
酪酸（Butyric acid）	19.74	19.43	19.06	18.73
イソ吉草酸（Isovaleric acid）	23.22	22.74	22.17	21.65
吉草酸（Valeric acid）	28.88	27.92	26.90	25.98
スベリン酸（Suberic acid）	30.30	28.01	25.98	24.27

\*保持時間は目安です。カラムにより変動する場合があります。

## 5-1 食品分野

図7に日本酒のクロマトグラムを示します。試料はメンブランフィルタでろ過後、10 $\mu$ L注入しています。33分付近に見られる負ピークは試料中のエタノールによるもので、酒の分析では一般に認められます。

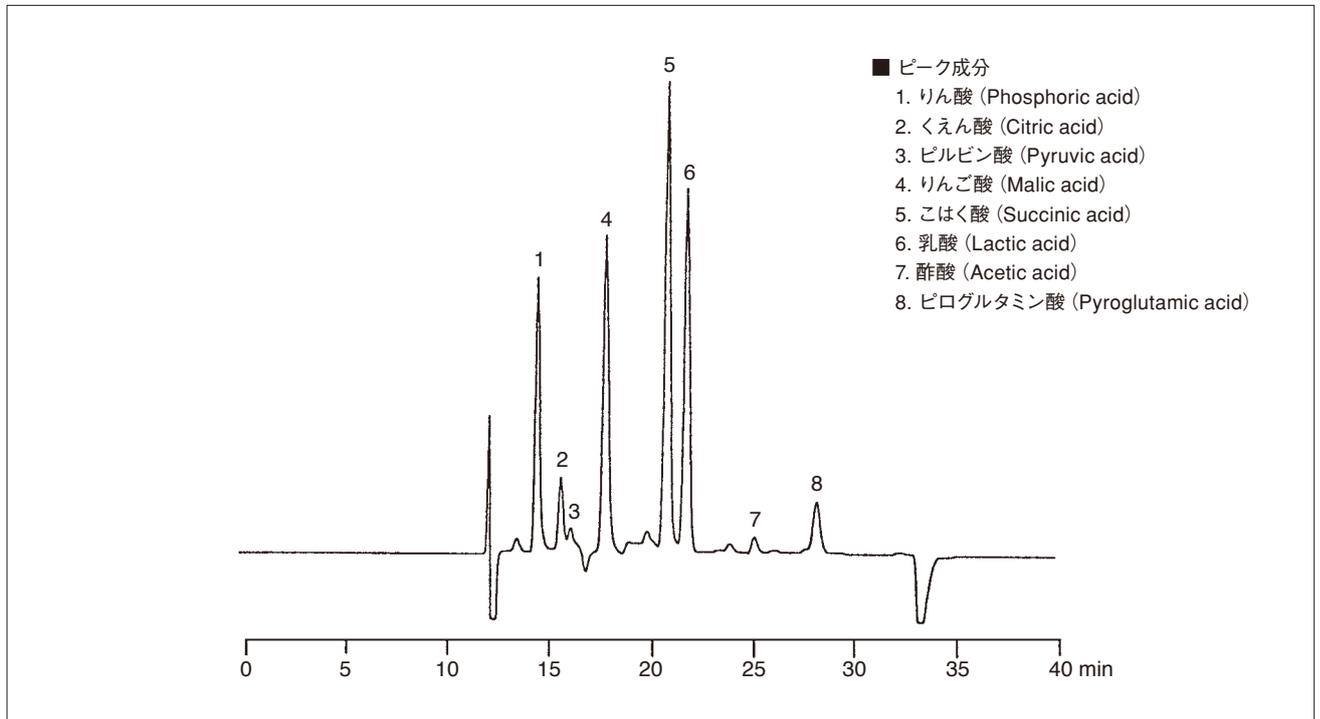


図7 日本酒のクロマトグラム

図8にワインのクロマトグラムを示します。試料は水で10倍に希釈してろ過後、10 $\mu$ L注入しています。

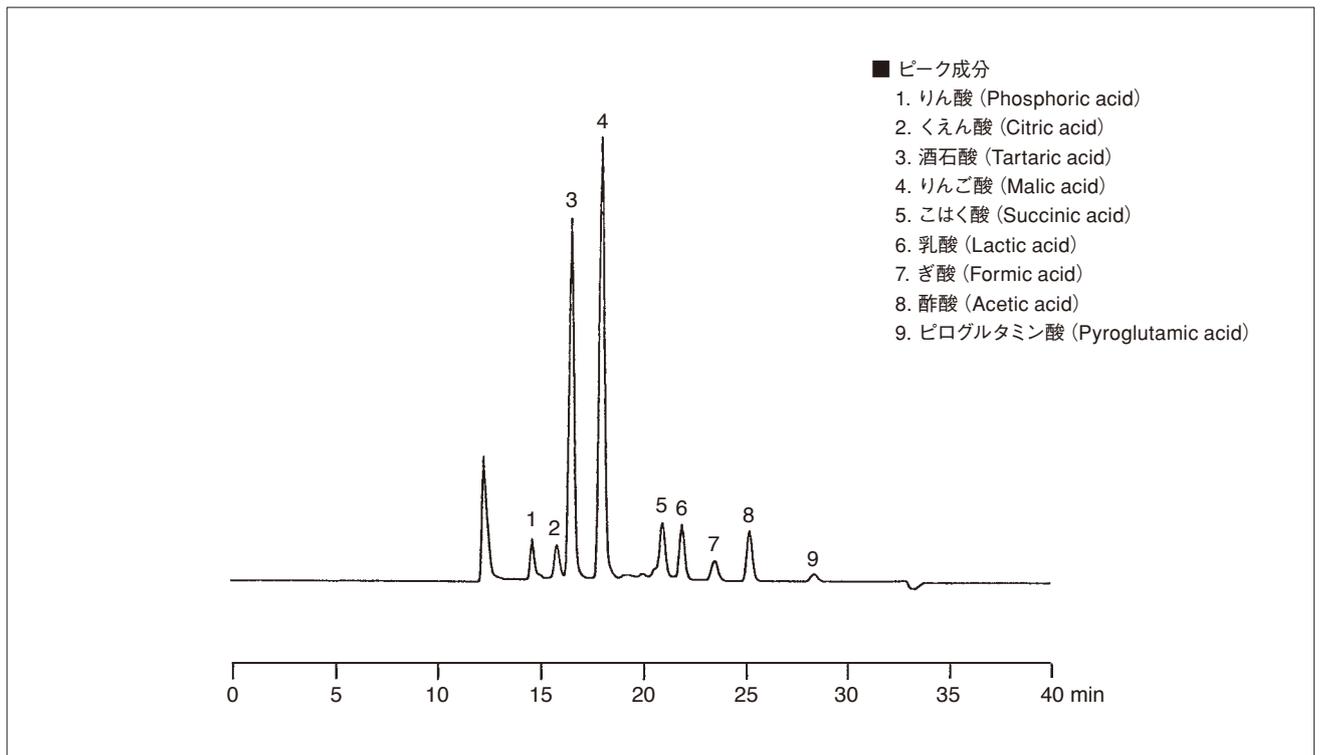


図8 ワインのクロマトグラム

(注) 図7～図14、図16のデータでは分析カラム2本で分析しています。  
図15および図17以降は分析カラム1本で分析しています。

## 5 応用例

図9にビールのクロマトグラムを示します。試料は振とうして炭酸ガスを除去してろ過後、10  $\mu$ Lを注入しています。ピーク番号10は炭酸のピークです。

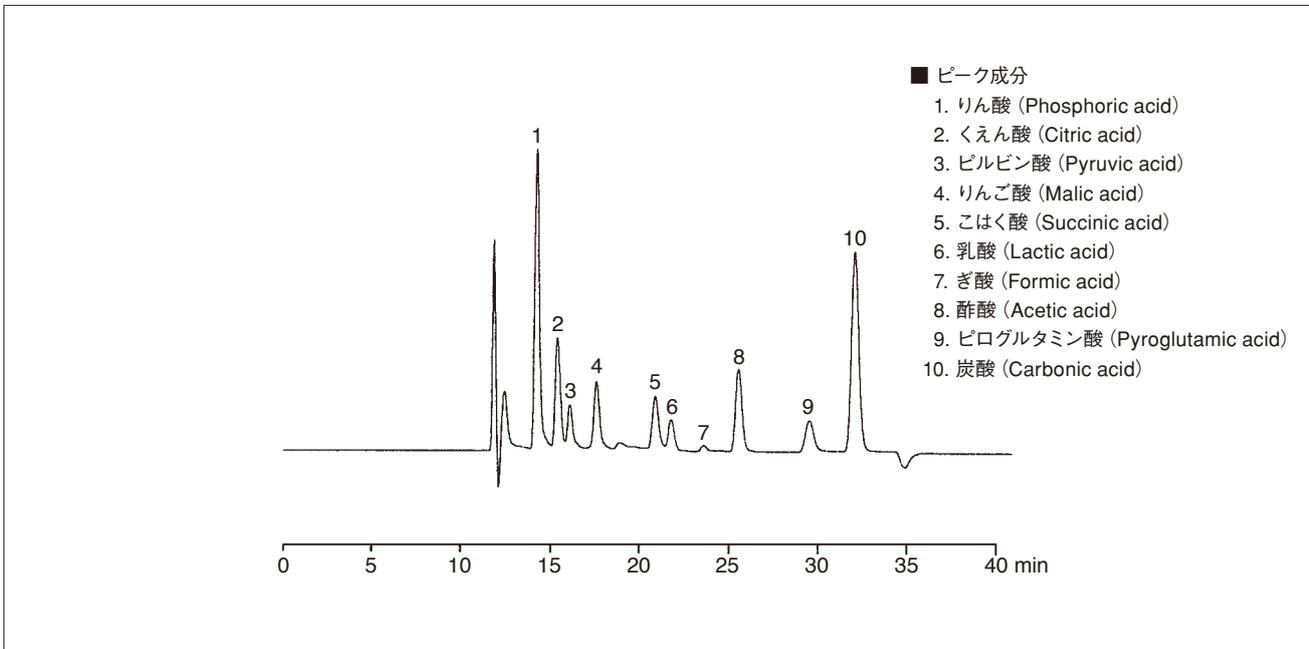


図9 ビールのクロマトグラム

図10に醤油のクロマトグラムを示します。試料は水で10倍に希釈してろ過後、10  $\mu$ Lを注入しています。

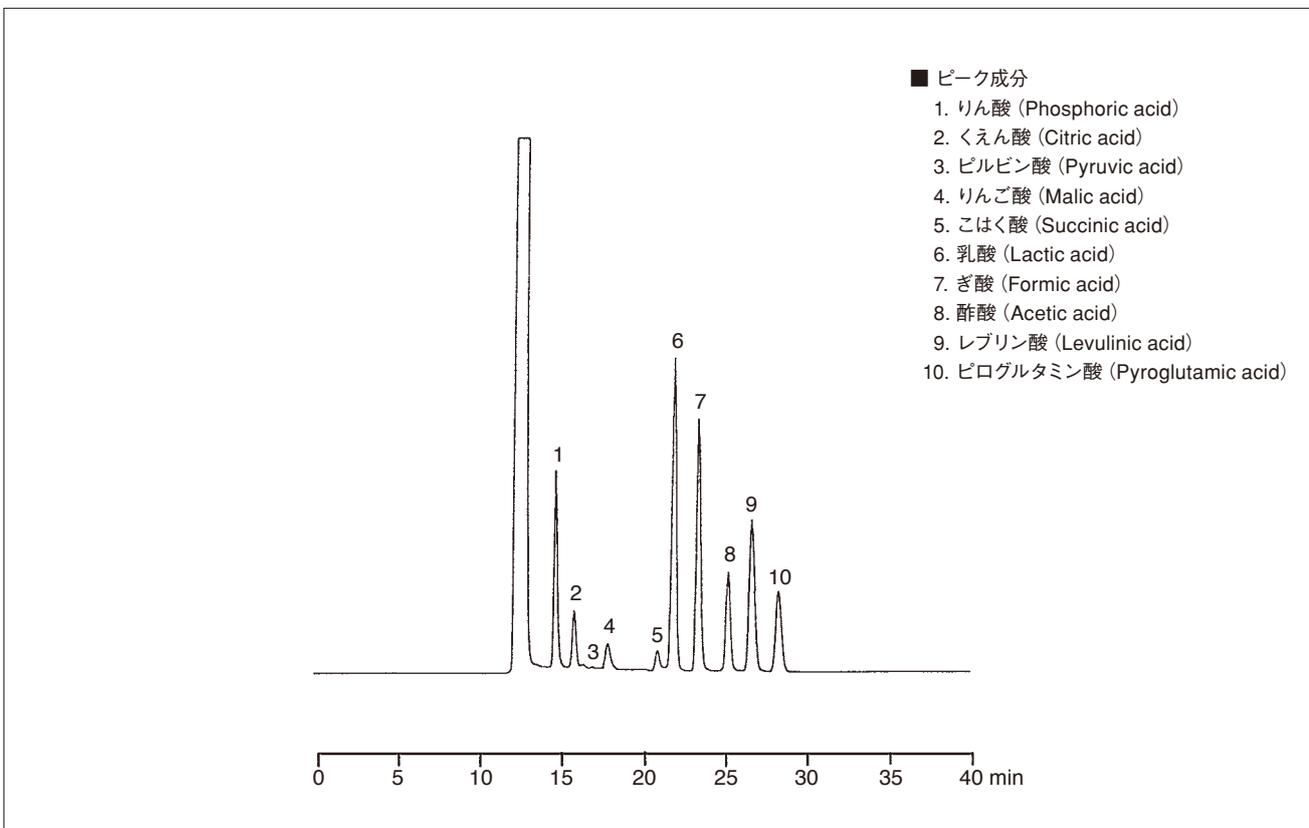


図10 醤油のクロマトグラム

図11にトマト果汁のクロマトグラムを示します。トマト果実をすりつぶして得た果汁を、水で10倍に希釈してろ過後、10 $\mu$ L注入しています。

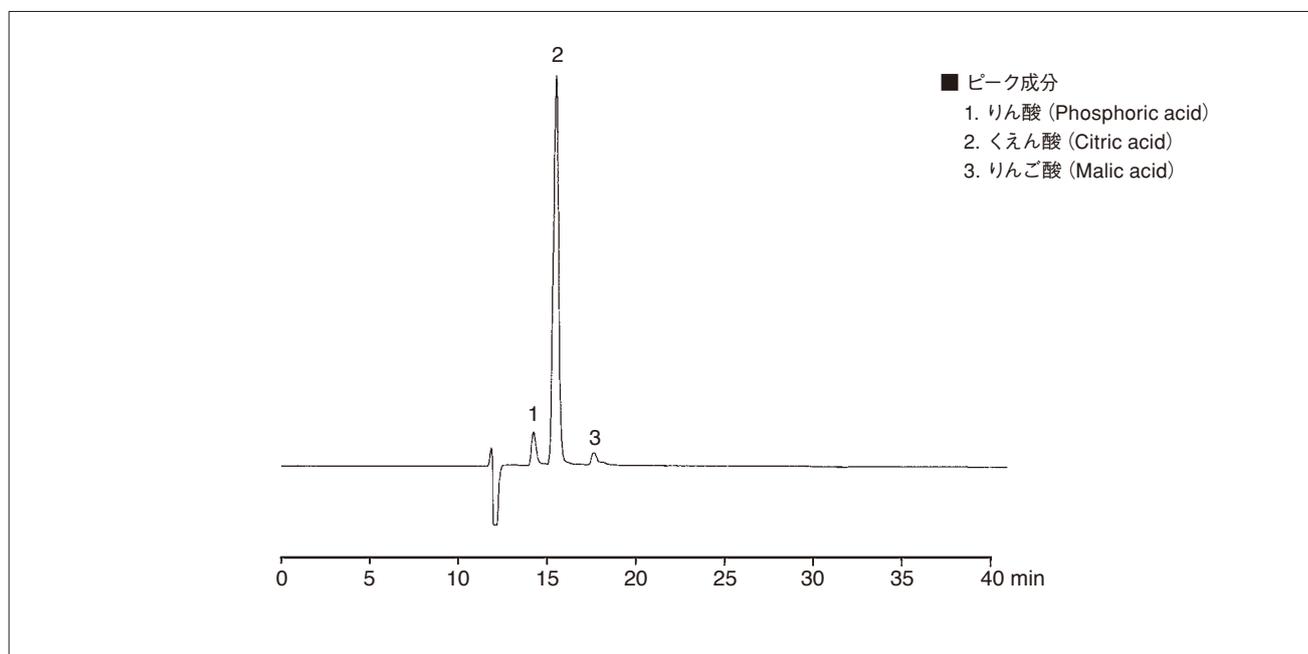


図11 トマト果汁のクロマトグラム

図12に梅汁のクロマトグラムを示します。梅果実（梅干し）をすりつぶして得た果汁を、水で10倍に希釈してろ過後、5 $\mu$ L注入しています。

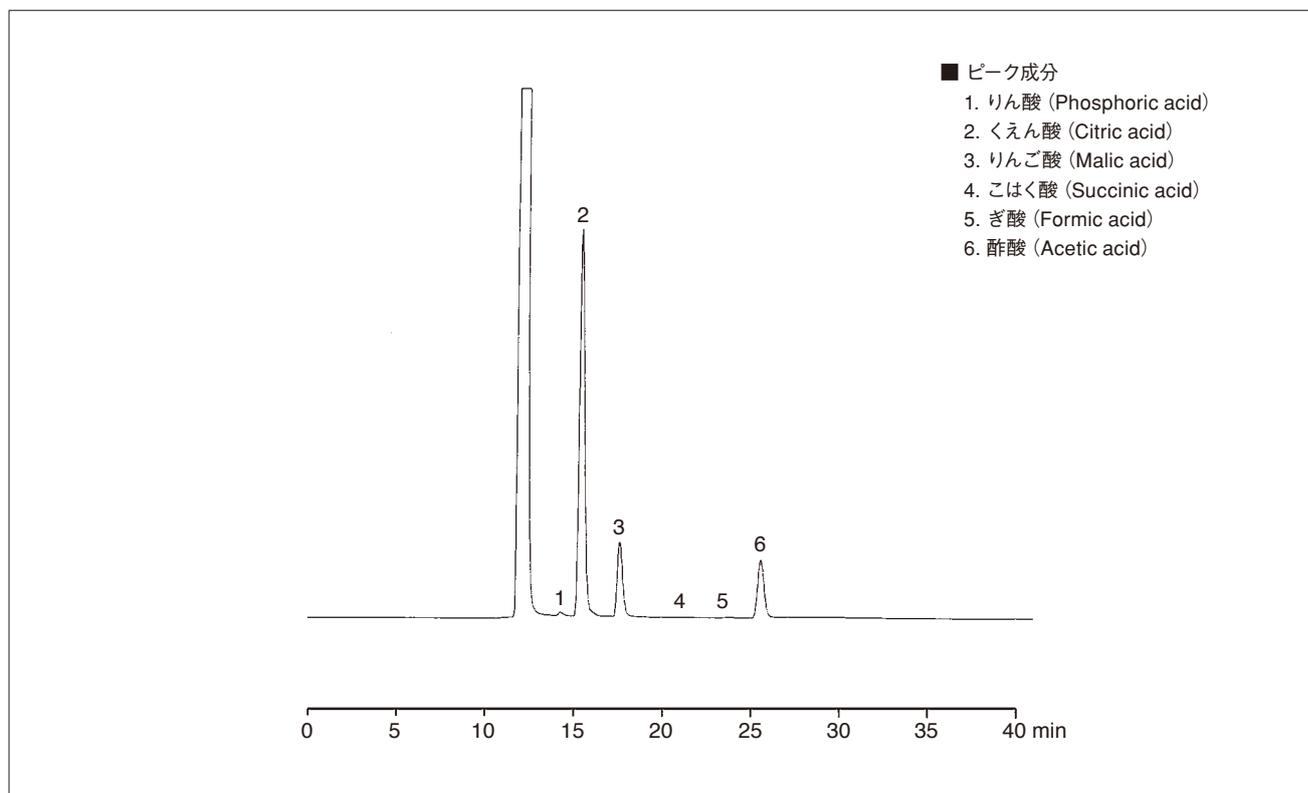


図12 梅汁のクロマトグラム

# 5 応用例

図13に昆布抽出液のクロマトグラムを示します。昆布を熱水で抽出し、ろ過後、10 $\mu$ L注入しています。

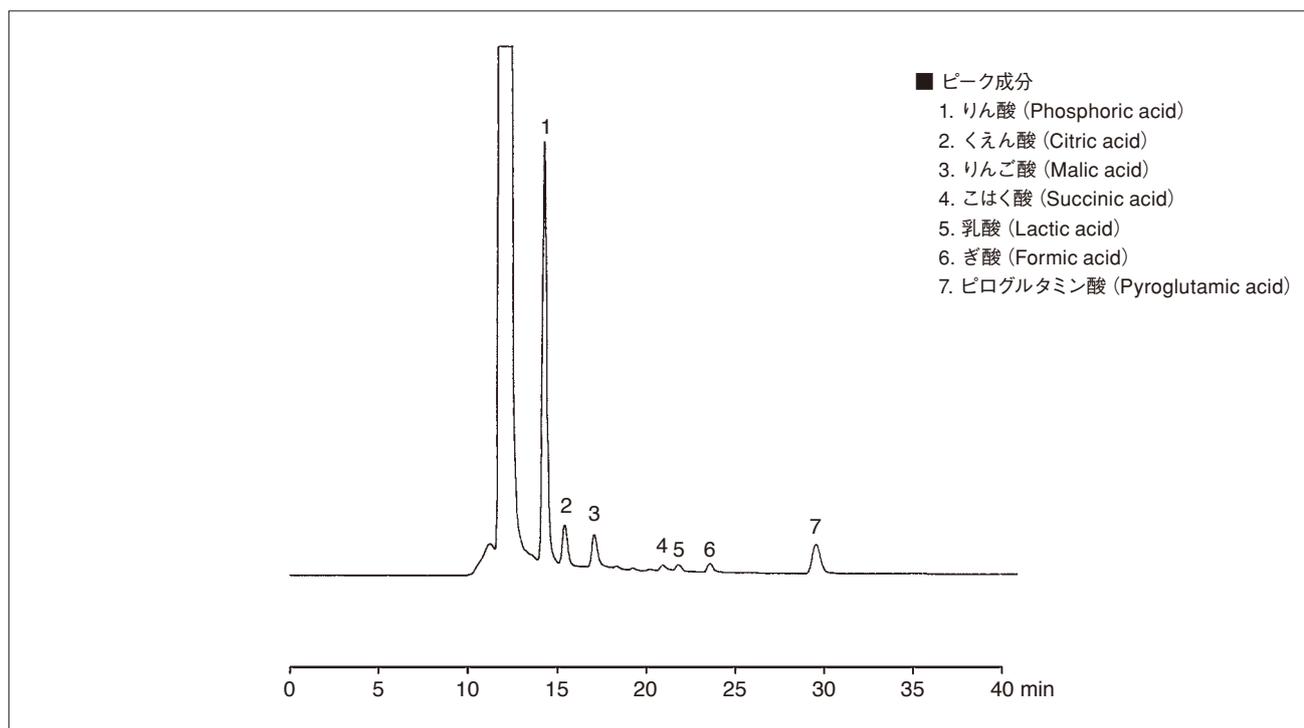


図13 昆布抽出液のクロマトグラム

図14にチーズ抽出液のクロマトグラムを示します。チーズに水を加えて100 mg/mLとし、振とうしながら50 $^{\circ}$ C下に30分間放置した後、限界ろ過（分画分子量：10000）を行い、そのろ液10 $\mu$ Lを注入しています。

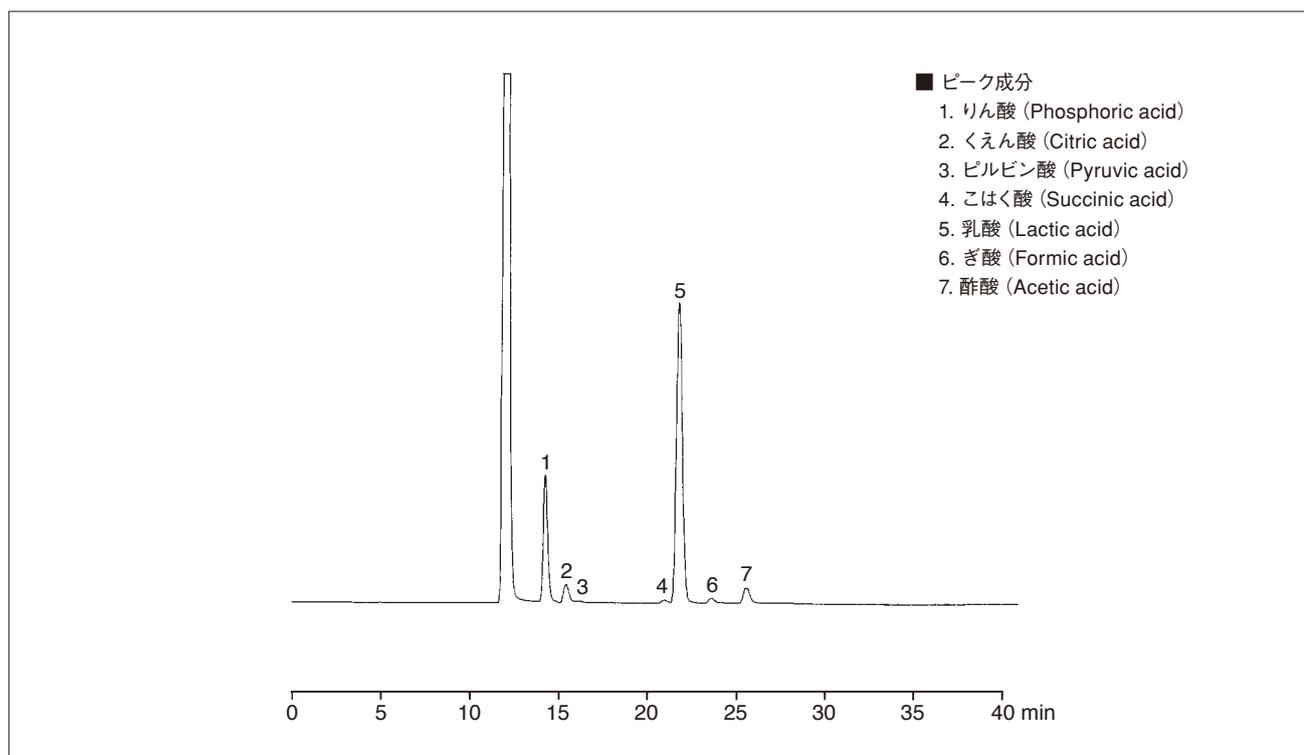


図14 チーズ抽出液のクロマトグラム

図15に微生物培養液のクロマトグラムを示します。試料は水で希釈してろ過後，10  $\mu$ Lを注入しています。酪酸などの脂肪酸が認められています。

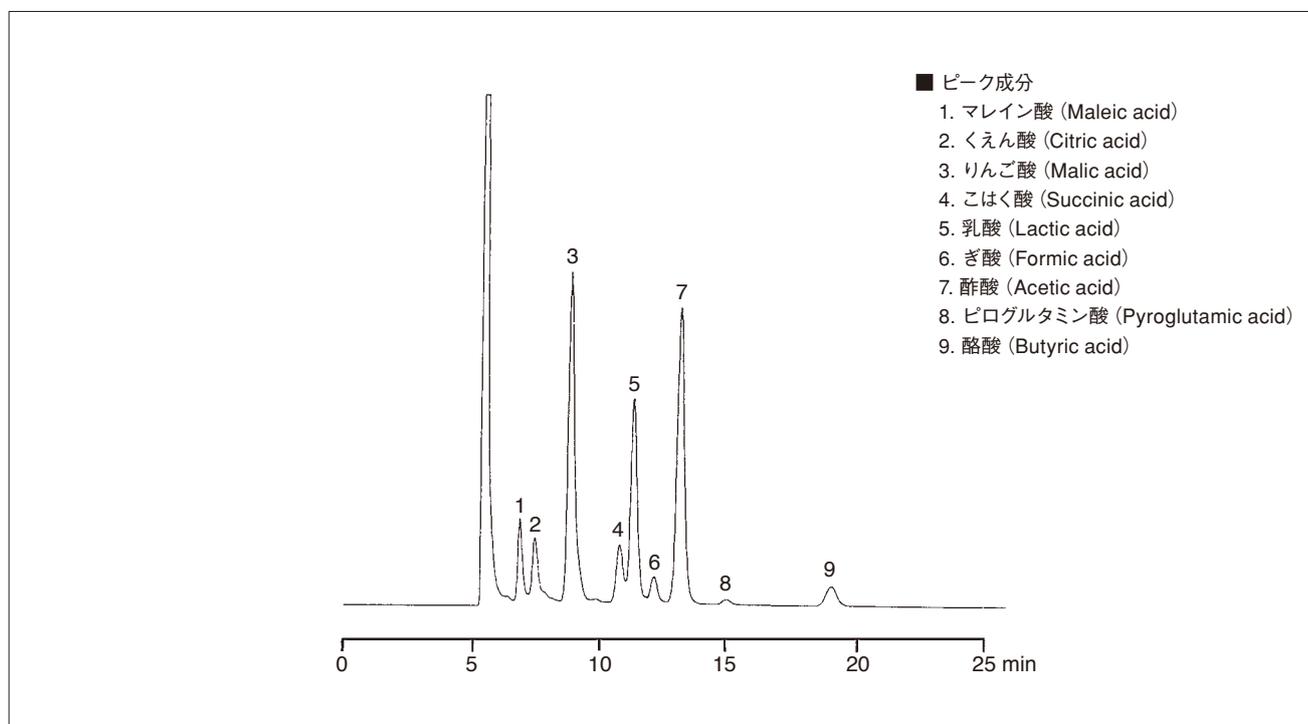


図15 微生物培養液のクロマトグラム

図16にヨーグルトのクロマトグラムを示します。試料は水で10倍に希釈してろ過後，10  $\mu$ L注入しています。

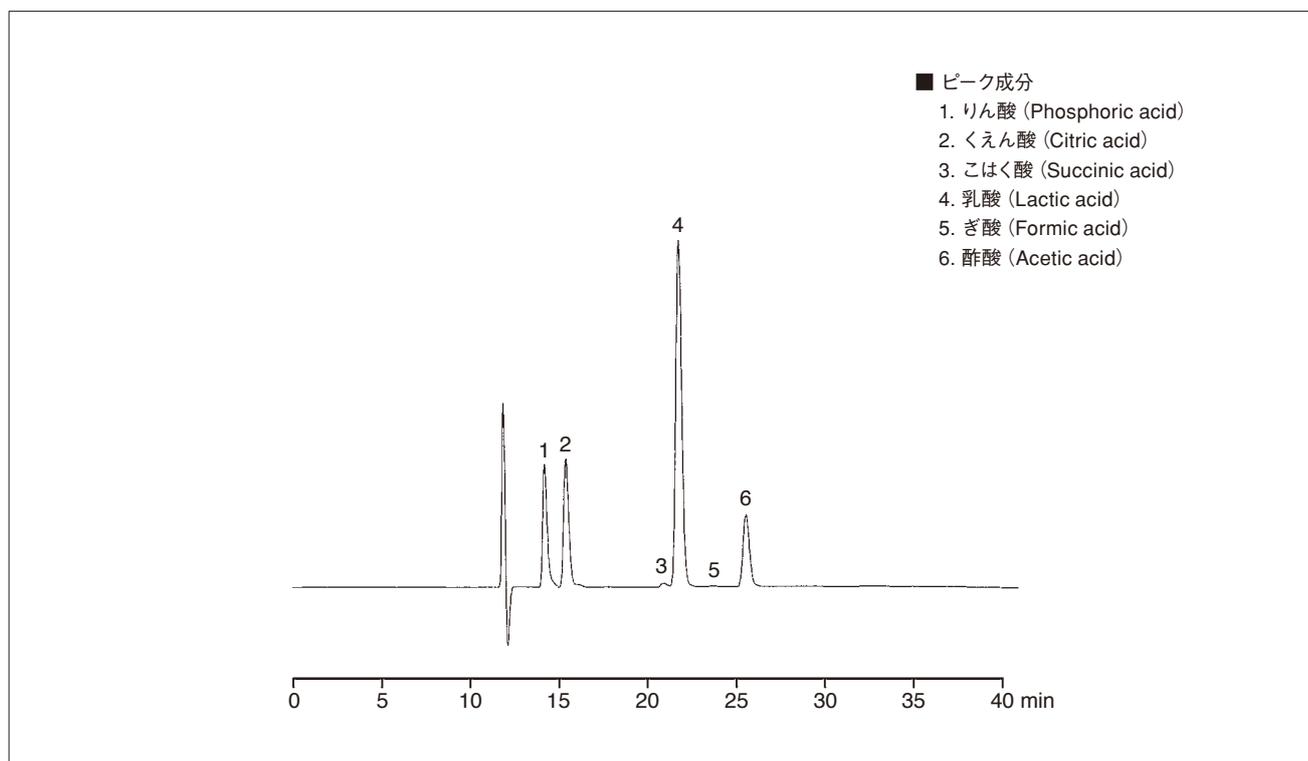


図16 ヨーグルトのクロマトグラム

## 5-2 医薬品分野

図17にカルシウム製剤抽出液のクロマトグラムを示します。製剤を50 mM過塩素酸水溶液に分散させる過後、10  $\mu$ Lを注入しています。

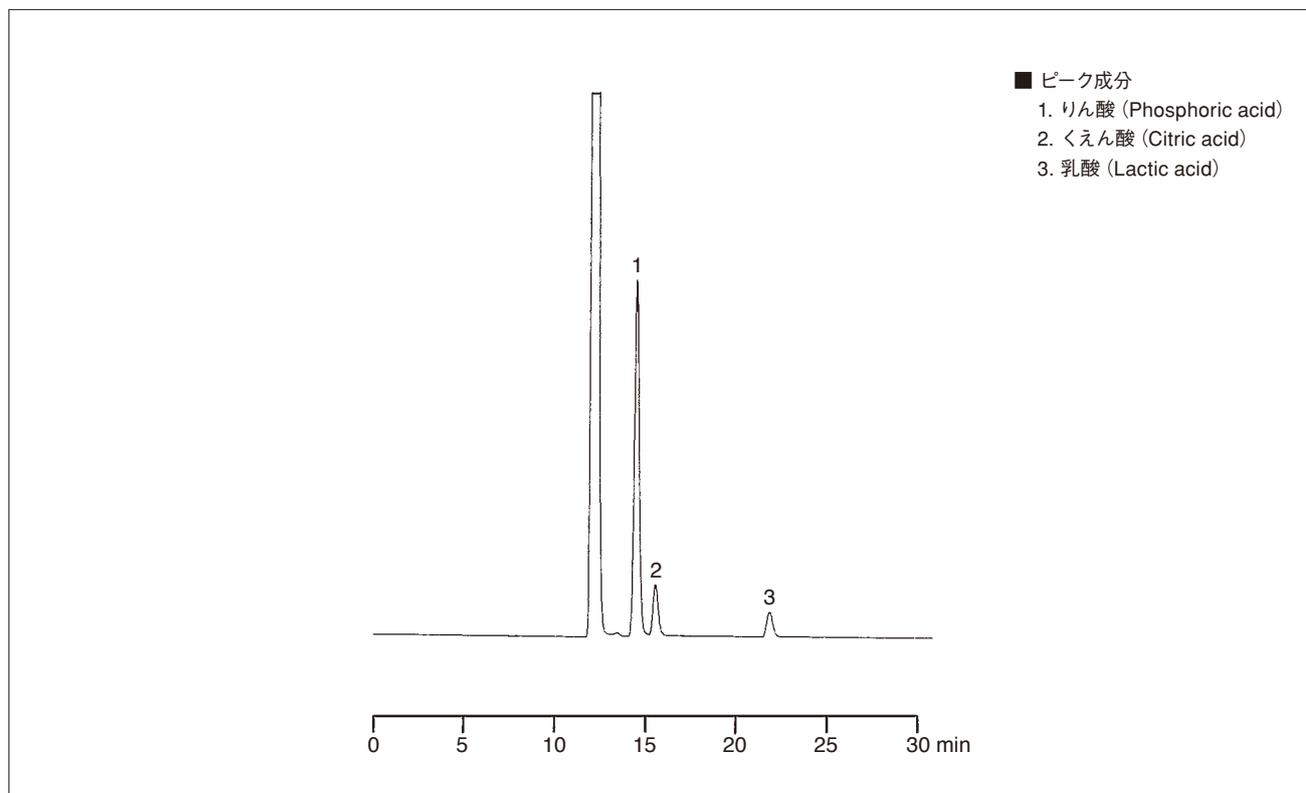


図17 カルシウム製剤抽出液のクロマトグラム

図18に透析液のクロマトグラムを示します。試料はろ過後、10  $\mu$ Lを注入しています。(P5, 表2の分析条件で分析)

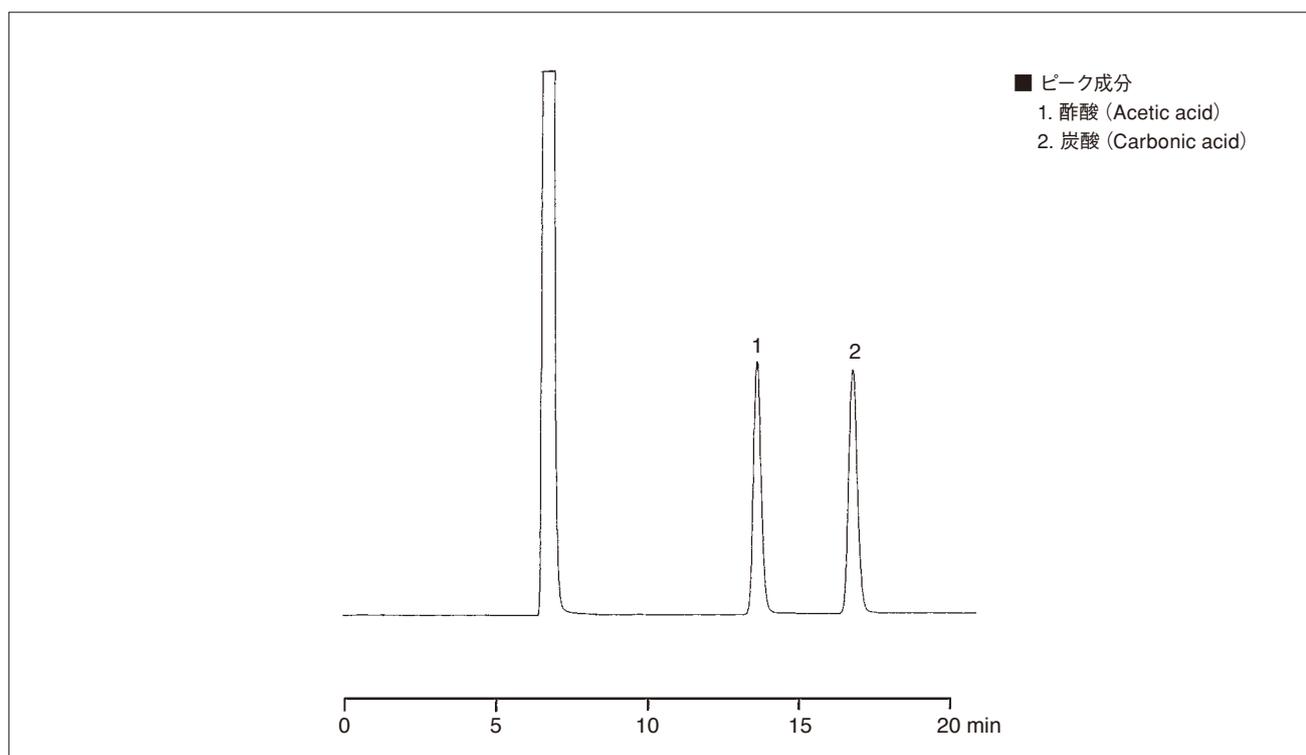


図18 透析液のクロマトグラム

図19に入浴剤抽出液のクロマトグラムを示します。製剤を水に分散させろ過後、10  $\mu$ Lを注入しています。  
(P5, 表2の分析条件で分析)

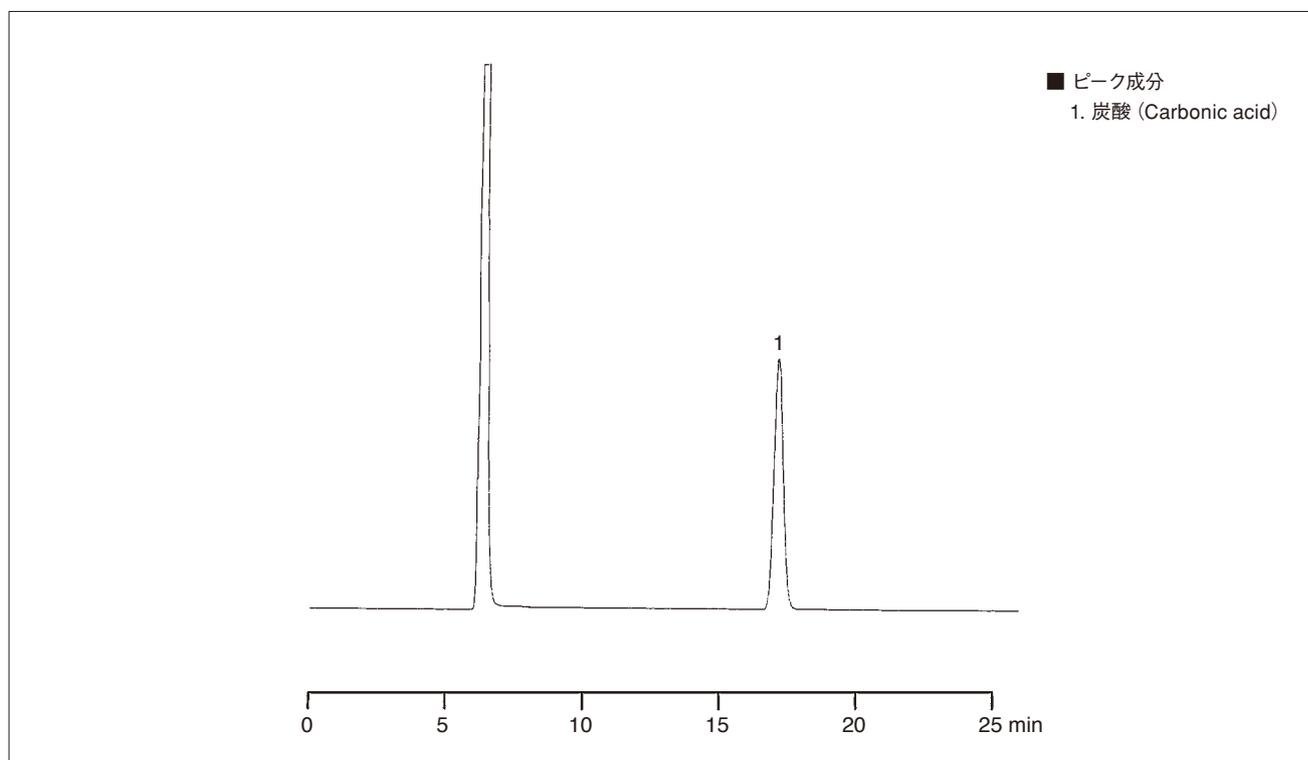


図19 入浴剤抽出液のクロマトグラム

## 5-3 環境分野

図20に環境水のクロマトグラムを示します。試料はろ過後、10 $\mu$ Lを注入しています。本分析システムはこのような環境水のモニタリングに使用することができます。

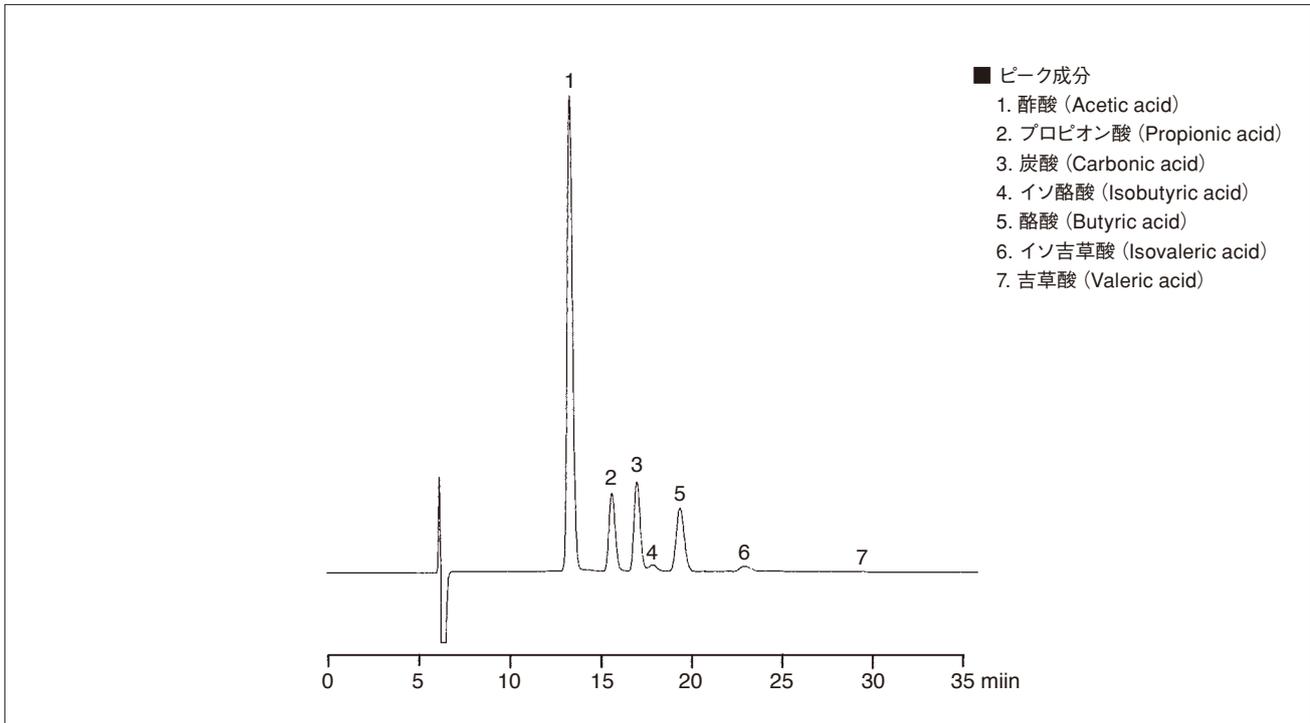


図20 環境水のクロマトグラム

図21に工場排水のクロマトグラムを示します。試料はろ過後、10 $\mu$ Lを注入しています。

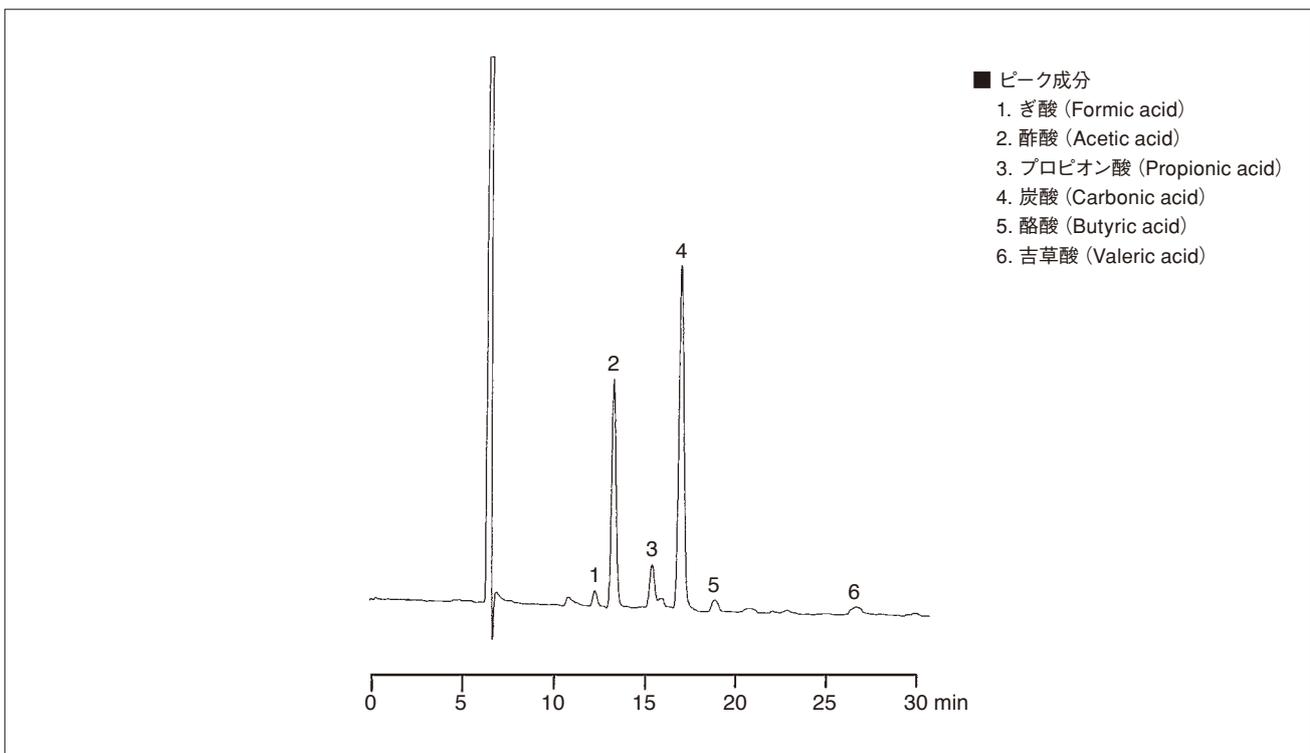


図21 工場排水のクロマトグラム

図22に水道水のクロマトグラムを示します。試料はろ過後，20  $\mu$ Lを注入しています。（P5，表2の分析条件で分析）

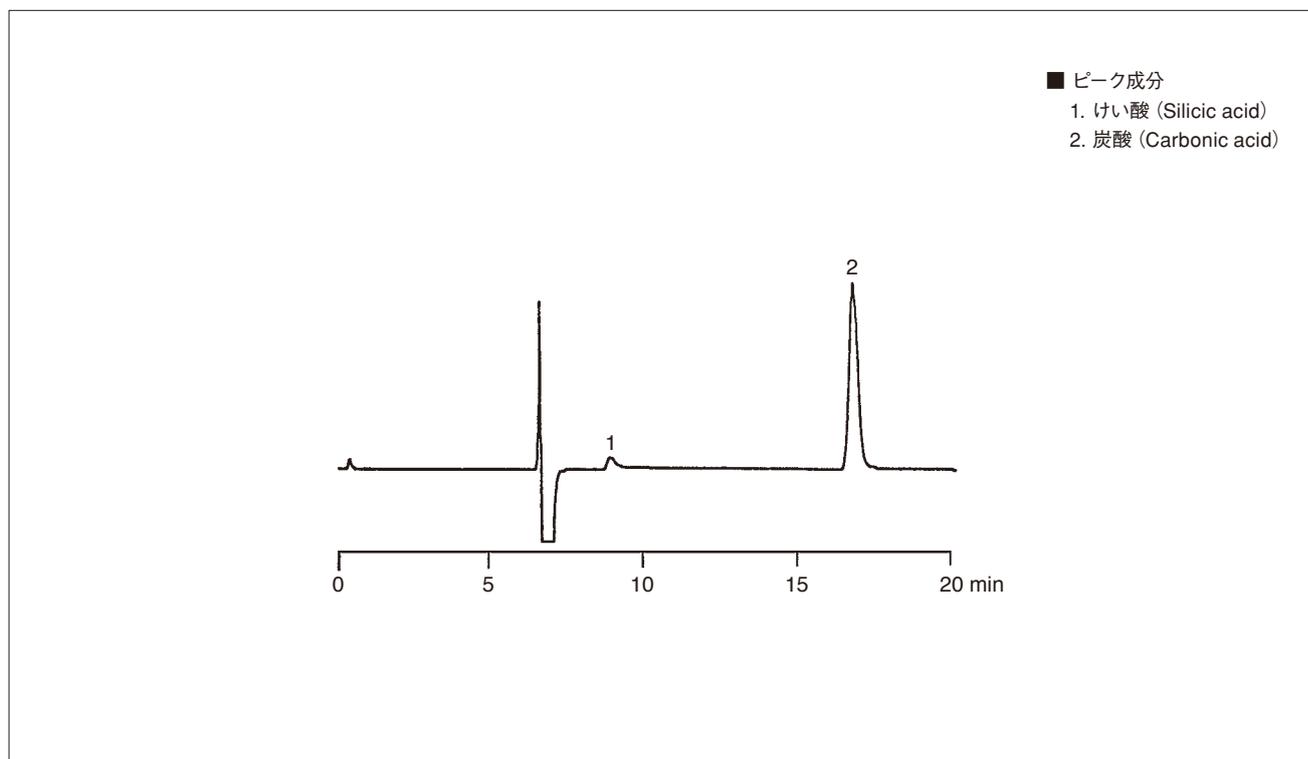


図22 水道水のクロマトグラム

# 株式会社 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

東京支社 101-8448 東京都千代田区神田錦町1丁目3  
(03) 3219-(官公庁担当)5631・(大学担当)5616・(会社担当) 5685

関西支社 530-0012 大阪府北区芝田1丁目1-4 阪急ターミナルビル14階  
(06) 6373-(官公庁・大学担当)6541・(会社担当) 6556

札幌支店 060-0807 札幌市北区北七条西2丁目8-1 札幌北ビル9階 (011)700-6605

東北支店 980-0021 仙台市青葉区中央2丁目9-27 プライムスクエア広瀬通12階 (022)221-6231

郡山営業所 963-8877 郡山市堂前町6-7 郡山フコク生命ビル2階 (024)939-3790

つくば支店 305-0031 つくば市吾妻3丁目17-1  
(029)851-(官公庁・大学担当) 8511・(会社担当) 8515

北関東支店 330-0843 さいたま市大宮区吉敷町1-41 明治安田生命大宮吉敷町ビル8階  
(048)646-(官公庁・大学担当) 0095・(会社担当) 0081

横浜支店 220-0004 横浜府西区北幸2丁目8-29 東武横浜第3ビル7階  
(045)312-(官公庁・大学担当) 4421・(会社担当) 311-4615

静岡支店 422-8062 静岡市駿河区稲川112丁目1-1 伊伝静岡駅南ビル2階 (054)285-0124

名古屋支店 450-0001 名古屋市中村区那古野1丁目47-1 名古屋国際センタービル19階  
(052)565-(官公庁・大学担当) 7521・(会社担当) 7531

京都支店 604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1  
(075)823-(官公庁・大学担当) 1604・(会社担当) 1603

神戸支店 650-0033 神戸市中央区江戸町9-3 栄光ビル9階 (078)331-9665

岡山営業所 700-0826 岡山市北区磨屋町3-10 住友生命岡山ニューシティビル6階 (086)221-2511

四国支店 760-0017 高松市番町1丁目6-1 住友生命高松ビル9階 (087)823-6623

広島支店 730-0036 広島市中区袋町4-25 明治安田生命広島ビル15階 (082)248-4312

九州支店 812-0039 福岡市博多区冷泉町4-20 島津博多ビル4階  
(092)283-(官公庁・大学担当) 3332・(会社担当) 3334

グローバルアプリケーション開発センター

京都 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1 (075)823-1187

東京 259-1304 秦野市堀山下380-1(秦野テクノパーク内) (0463)88-8660

島津コールセンター (操作・分析に関する電話相談窓口) ☎ 0120-131691  
(075)813-1691

<http://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行日 1994年11月 1日  
第2版 1997年10月 1日(A)  
第3版 2001年 8月 1日(B)  
第4版 2007年 3月 1日(C)  
第5版 2008年 4月 1日(D)  
第6版 2013年 6月 1日(E)

※掲載データは業事承認された装置で採取したものではありません。  
※本誌は各掲載データ採取時の情報に基づいて編集されています。  
※掲載データは参考データであり、保証を行うものではありません。  
また、予告なく改訂することがあります。  
※現在販売終了となっている製品等を使用している場合があります。