

Technical Report

Shim-pack Fast-OAとpH緩衝化電気伝導度検出法による有機酸分析の高速化

High-speed analysis of organic acids by Shim-pack Fast-OA and pH-buffered electrical conductivity detection

中島 みのり¹、小寺澤 功明¹

Abstract:

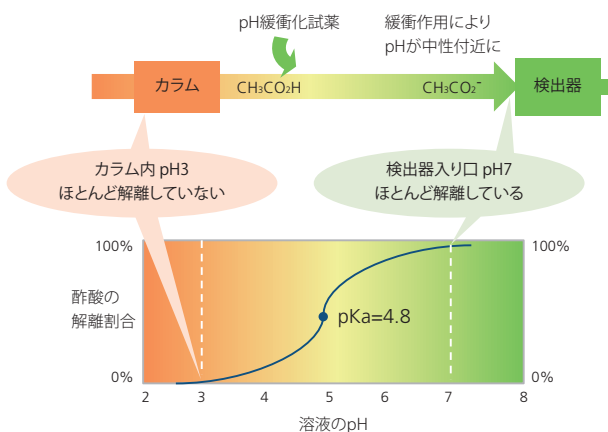
有機酸は食品中だけでなく、医薬品のカウンターイオンや、化成品の原料としても様々な分野で分析されています。ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法は有機酸を選択的かつ高感度に分析でき、夾雑成分を多く含む試料の分析に活用されています。一方で、発酵状態のモニタリングや腸内細菌叢の研究においては、分析時間の短縮が課題となっていました。また、バイオマス原料による新エネルギー製造などの研究でも、微生物の活動を柔軟に制御するために代謝産物である有機酸を迅速に定量する必要があります。本レポートでは、高速有機酸分析カラムShim-pack Fast-OAとポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法とを組み合わせた、選択性の高い有機酸の高速分析の技術について解説します。

Keywords: 有機酸分析、高速化、ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法、有機酸分析移動相試薬セット

1. 電気伝導度検出法による有機酸分析

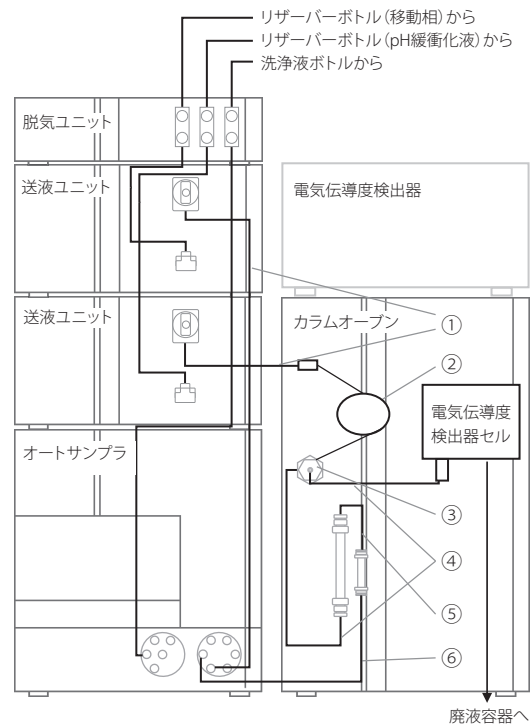
有機酸はカルボキシル基を有するため、短波長に吸収を持ちますが、夾雑成分の影響を受けやすく、高感度かつ特異的に定量するためには、検出方法を工夫する必要があります。

島津製作所独自のポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法では、カラム分離後にpH緩衝化試薬を連続的に加えてpHを中性付近にすることにより、バックグラウンドノイズを低減させるだけでなく、分析対象の有機酸を解離させ、電気伝導度検出法で有機酸を高感度に選択性良く検出します。



ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法はポストカラム緩衝化用流路と電気伝導度検出器CDD-10A_{VP}を組み合わせることで構築します。Fig. 2に配管図を示します。カラムによって分離された有機酸各成分がミキサー部分でpH緩衝化液と混合され、解離状態に移行し、電気伝導度検出器で高感度に検出されます。

移動相とpH緩衝化液は有機酸分析移動相試薬セット (P/N: 228-61465-91) を使用することで、調製の手間なくすぐに分析を開始できます。



| 流路部品 | |
|------|-------------------------------------|
| 1 | 0.3 mm I.D. x 600 mm L. ステンレス製配管 |
| 2 | 0.1 mm I.D. x 2000 mm L. ステンレス製配管 |
| 3 | 高効率マイクロリアクターミキサー MR 100 |
| 4 | 0.13 mm I.D. PEEK製配管 (100 mm 長さ) *1 |
| 5 | ガードカラム付属 ステンレス製配管 |
| 6 | 0.1 mm I.D. x 600 mm L. ステンレス製配管 |

*1: 1巻2mで販売されているものをチューブカッターにて切断して使用。

Fig. 2 配管図

2. 有機酸高速分析カラムの保持時間インデックス

Shim-pack Fast-OAはイオン排除型ポリマー充填カラムで酸性移動相を用いて、各試料成分のpKaに準じた分離が可能となります。本カラムでの分析条件をTable 1に、Fig. 3に有機酸25成分のクロマトグラムを示します。有機酸の高速分析に最適化されたカラム設計により、吉草酸などの保持の強い短鎖脂肪酸であっても、10分以内に溶出します。

次に本カラムでの有機酸各成分の保持時間の目安をTable 2、Fig. 4に示します。イオン排除モードでは分離の状態はカラム温度および移動相の濃度に依存します。対象成分の分離が不十分な場合は、Table 2やFig. 4を参考にカラム温度を変更することで改善が期待できます。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。

Table 1 分析条件

| | |
|-----------------------|---|
| Column | : Shim-pack Fast-OA (100 mm L. × 7.8 mm I.D., 5 μm) |
| Guard column | : Shim-pack Fast-OA (G) (10 mm L. × 4.0 mm I.D.) |
| Mobile phase | : 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid (有機酸分析移動相試薬セット 移動相) |
| Flow rate | : 0.8 mL/min |
| pH buffering solution | : 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid 20 mmol/L Bis- Tris 0.1 mmol/L EDTA (有機酸分析移動相試薬セット pH緩衝化試薬) |
| Flow rate | : 0.8 mL/min |
| Detection | : Conductivity detector (CDD-10A _{vp}) |
| Injection volume | : 10 μL |

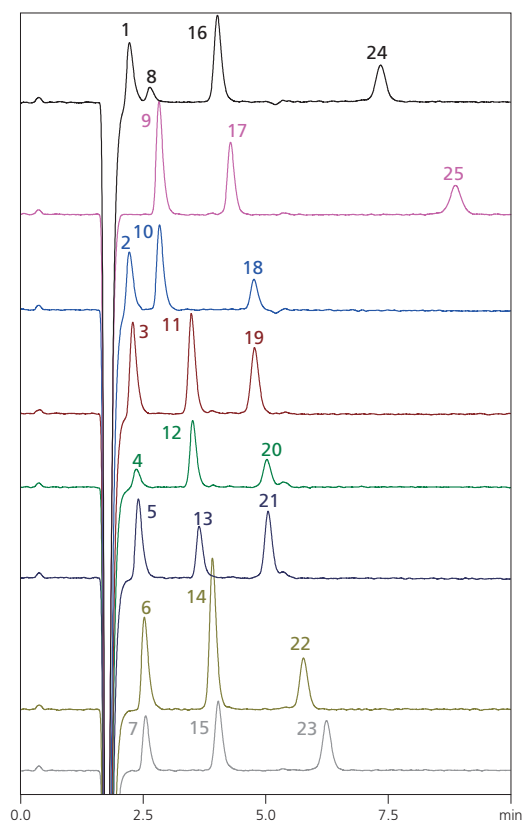


Fig. 3 45°Cにおける各標準試料のクロマトグラム

* 1.8分付近に試料溶媒(水)由来のベースラインの落ち込みがみられる
* ピーク番号はTable 2を参照

Table 2 有機酸保持時間の目安(カラム1本)

| | Organic acids | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C |
|----|---------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | りん酸 | 2.209 | 2.228 | 2.250 | 2.272 |
| 2 | マレイン酸 | 2.260 | 2.252 | 2.244 | 2.237 |
| 3 | α-ケトグルタル酸 | 2.333 | 2.321 | 2.310 | 2.299 |
| 4 | グルクロン酸 | 2.377 | 2.380 | 2.384 | 2.385 |
| 5 | くえん酸 | 2.444 | 2.432 | 2.421 | 2.410 |
| 6 | 酒石酸 | 2.565 | 2.553 | 2.543 | 2.532 |
| 7 | ビルビン酸 | 2.577 | 2.573 | 2.570 | 2.566 |
| 8 | グルコン酸 | 2.654 | 2.657 | 2.659 | 2.660 |
| 9 | マロン酸 | 2.874 | 2.857 | 2.841 | 2.826 |
| 10 | りんご酸 | 2.883 | 2.866 | 2.850 | 2.835 |
| 11 | こはく酸 | 3.573 | 3.531 | 3.490 | 3.451 |
| 12 | グリコール酸 | 3.545 | 3.531 | 3.519 | 3.505 |
| 13 | 乳酸 | 3.657 | 3.654 | 3.649 | 3.642 |
| 14 | ぎ酸 | 3.951 | 3.934 | 3.918 | 3.900 |
| 15 | グルタル酸 | 4.221 | 4.121 | 4.031 | 3.946 |
| 16 | フマル酸 | 4.246 | 4.124 | 4.015 | 3.914 |
| 17 | 酢酸 | 4.329 | 4.307 | 4.284 | 4.260 |
| 18 | レプリン酸 | 4.950 | 4.850 | 4.754 | 4.662 |
| 19 | アジピン酸 | 5.083 | 4.916 | 4.763 | 4.622 |
| 20 | ピログルタミン酸 | 5.238 | 5.116 | 5.012 | 4.916 |
| 21 | プロピオン酸 | 5.125 | 5.084 | 5.041 | 4.995 |
| 22 | イソ酪酸 | 5.879 | 5.823 | 5.763 | 5.696 |
| 23 | 酪酸 | 6.400 | 6.316 | 6.227 | 6.134 |
| 24 | イソ吉草酸 | 7.594 | 7.464 | 7.328 | 7.182 |
| 25 | 吉草酸 | 9.355 | 9.099 | 8.840 | 8.584 |

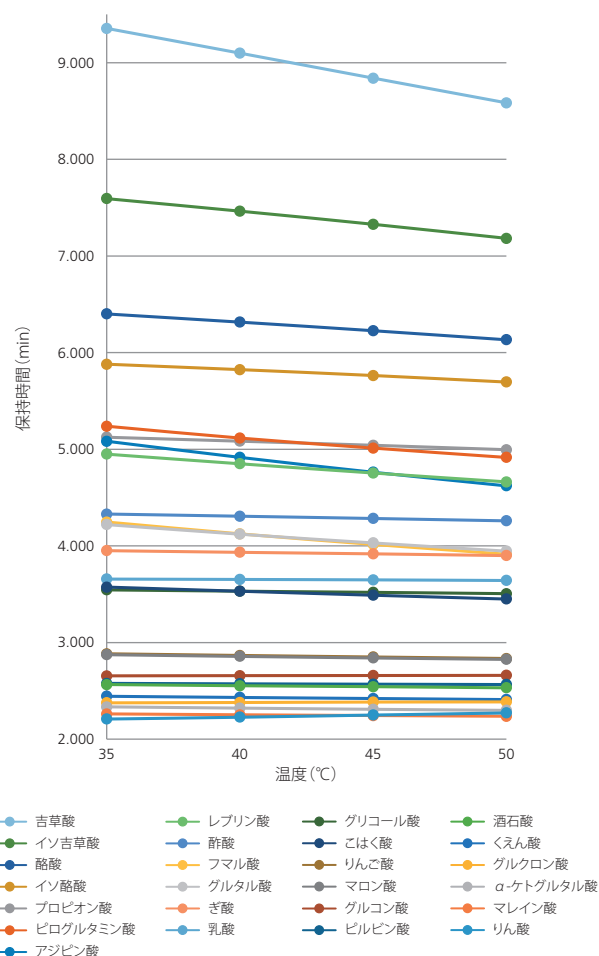


Fig. 4 温度による有機酸保持時間の傾向

3. 複数カラムの連結による分離改善

カラム1本での分離が厳しい場合、Shim-pack Fast-OAを3本まで直列に接続し、分離を改善することができます。Table 3にカラムを2本連結した場合の保持時間の目安、Table 4にカラムを3本連結した場合の保持時間の目安を示します。

例えば、乳酸とぎ酸は保持時間にほとんど差が無く、カラム1本では完全分離が困難です。Fig. 5にカラムを3本まで連結させたときのクロマトグラムを示します。カラムを連結することで、分離が改善されることが分かります。

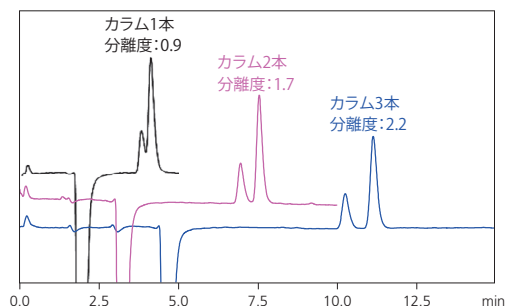


Fig. 5 カラムの連結による分離向上

Table 3 有機酸保持時間の目安 (カラム2本)

| | Organic acids | 35℃ | 40℃ | 45℃ | 50℃ |
|----|---------------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | りん酸 | 4.017 | 4.051 | 4.090 | 4.126 |
| 2 | マレイン酸 | 4.150 | 4.118 | 4.086 | 4.062 |
| 3 | α-ケトグルタル酸 | 4.292 | 4.260 | 4.219 | 4.178 |
| 4 | グルクロン酸 | 4.415 | 4.409 | 4.403 | 4.400 |
| 5 | くえん酸 | 4.531 | 4.489 | 4.449 | 4.412 |
| 6 | 酒石酸 | 4.783 | 4.743 | 4.704 | 4.666 |
| 7 | ピルビン酸 | 4.821 | 4.796 | 4.772 | 4.755 |
| 8 | グルコン酸 | 4.988 | 4.986 | 4.973 | 4.957 |
| 9 | マロン酸 | 5.452 | 5.400 | 5.347 | 5.305 |
| 10 | りんご酸 | 5.455 | 5.402 | 5.350 | 5.303 |
| 11 | こはく酸 | 6.906 | 6.796 | 6.688 | 6.585 |
| 12 | グリコール酸 | 6.860 | 6.813 | 6.764 | 6.724 |
| 13 | 乳酸 | 7.089 | 7.072 | 7.040 | 7.003 |
| 14 | ぎ酸 | 7.710 | 7.657 | 7.599 | 7.549 |
| 15 | グルタル酸 | 8.253 | 8.019 | 7.798 | 7.601 |
| 16 | フマル酸 | 8.271 | 7.996 | 7.738 | 7.508 |
| 17 | 酢酸 | 8.503 | 8.435 | 8.361 | 8.293 |
| 18 | レブリン酸 | 9.787 | 9.556 | 9.320 | 9.096 |
| 19 | アジピン酸 | 10.068 | 9.687 | 9.328 | 9.009 |
| 20 | ピログルタミン酸 | 10.345 | 10.076 | 9.822 | 9.601 |
| 21 | プロピオン酸 | 10.154 | 10.043 | 9.923 | 9.799 |
| 22 | イソ酪酸 | 11.738 | 11.589 | 11.423 | 11.257 |
| 23 | 酪酸 | 12.807 | 12.608 | 12.380 | 12.147 |
| 24 | イソ吉草酸 | 15.296 | 14.991 | 14.640 | 14.310 |
| 25 | 吉草酸 | 18.927 | 18.335 | 17.723 | 17.136 |

Table 4 有機酸保持時間の目安 (カラム3本)

| | Organic acids | 35℃ | 40℃ | 45℃ | 50℃ |
|----|---------------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | りん酸 | 5.852 | 5.908 | 5.969 | 6.037 |
| 2 | マレイン酸 | 6.050 | 6.014 | 5.978 | 5.948 |
| 3 | α-ケトグルタル酸 | 6.268 | 6.210 | 6.174 | 6.124 |
| 4 | グルクロン酸 | 6.435 | 6.432 | 6.435 | 6.437 |
| 5 | くえん酸 | 6.624 | 6.574 | 6.522 | 6.477 |
| 6 | 酒石酸 | 6.996 | 6.946 | 6.897 | 6.856 |
| 7 | ピルビン酸 | 7.047 | 7.022 | 6.997 | 6.976 |
| 8 | グルコン酸 | 7.303 | 7.289 | 7.292 | 7.282 |
| 9 | マロン酸 | 7.979 | 7.911 | 7.848 | 7.792 |
| 10 | りんご酸 | 8.000 | 7.934 | 7.867 | 7.808 |
| 11 | こはく酸 | 10.168 | 10.016 | 9.868 | 9.734 |
| 12 | グリコール酸 | 10.085 | 10.031 | 9.974 | 9.922 |
| 13 | 乳酸 | 10.437 | 10.406 | 10.383 | 10.345 |
| 14 | ぎ酸 | 11.349 | 11.278 | 11.210 | 11.148 |
| 15 | グルタル酸 | 12.184 | 11.855 | 11.543 | 11.263 |
| 16 | フマル酸 | 12.192 | 11.802 | 11.438 | 11.118 |
| 17 | 酢酸 | 12.540 | 12.455 | 12.363 | 12.272 |
| 18 | レブリン酸 | 14.478 | 14.135 | 13.814 | 13.501 |
| 19 | アジピン酸 | 14.896 | 14.344 | 13.834 | 13.372 |
| 20 | ピログルタミン酸 | 15.290 | 14.912 | 14.558 | 14.244 |
| 21 | プロピオン酸 | 15.016 | 14.866 | 14.705 | 14.545 |
| 22 | イソ酪酸 | 17.383 | 17.181 | 16.959 | 16.730 |
| 23 | 酪酸 | 18.993 | 18.693 | 18.392 | 18.069 |
| 24 | イソ吉草酸 | 22.707 | 22.261 | 21.792 | 21.314 |
| 25 | 吉草酸 | 28.180 | 27.323 | 26.455 | 25.607 |

4. 標準試料の分析例

扱う試料の種類によって、分析対象となる有機酸の種類は異なります。Fig. 6～9にいくつかの分野で対象となる有機酸の分離パターンを示します。

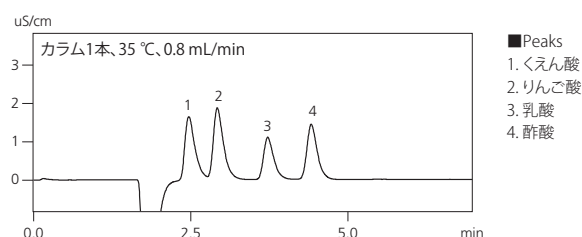


Fig. 6 食品分野向け 有機酸4成分

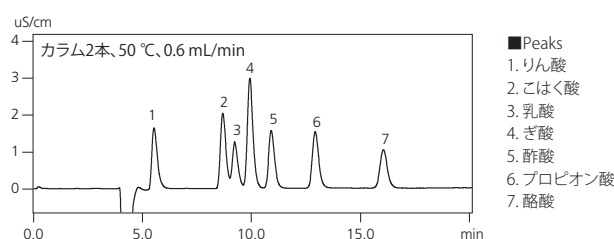


Fig. 7 腸内細菌叢研究分野向け 有機酸7成分

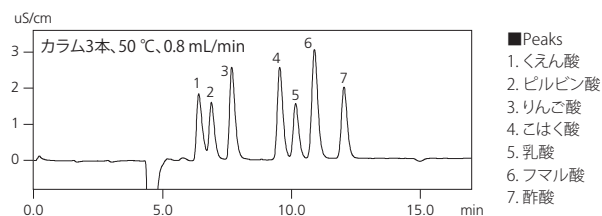


Fig. 8 培地分析向け 有機酸7成分

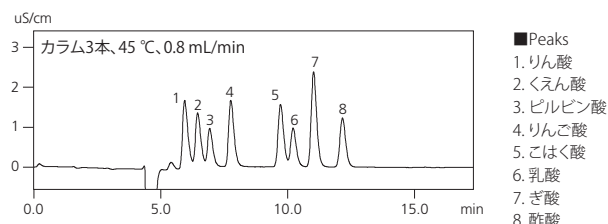


Fig. 9 有機酸8成分

5. 実試料の分析

有機酸高速分析カラム Shim-pack Fast-OAとpH緩衝化電気伝導度検出法の組み合わせは発酵モニタリングなど、夾雑成分を多く含む試料の高速分析が求められる分野に最適な分析法です。

Fig. 10に液体培地に添加した有機酸のクロマトグラムを、Table 5に分析条件を示します。分析サイクルタイムを20分以下に短縮できるため、移動相消費量を節約し、業務を効率化できるだけでなく、分析結果によって、培養の状態をコントロールしたり、繰り返しの分析数を確保することが可能です。Table 6に有機酸7成分の検量線濃度範囲と寄与率を、Fig. 11に検量線を示します。いずれの成分においても寄与率 $R^2=0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。

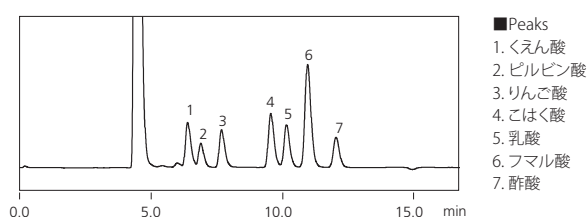


Fig.10 液体培地 (有機酸添加) のクロマトグラム

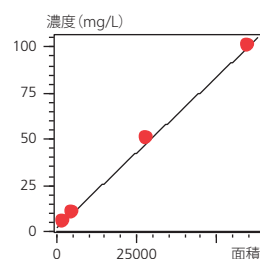
Table 5 分析条件

| | |
|-----------------------|---|
| Column | : Shim-pack Fast-OA 3 columns in series (100 mm L. × 7.8 mm I.D., 5 μm) |
| Guard column | : Shim-pack Fast-OA (G) (10 mmL. × 4.0 mm I.D.) |
| Mobile phase | : 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid (有機酸分析移動相試薬セット 移動相) |
| Flow rate | : 0.8 mL/min |
| pH buffering solution | : 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid 20 mmol/L Bis- Tris 0.1 mmol/L EDTA (有機酸分析移動相試薬セット pH緩衝化試薬) |
| Flow rate | : 0.8 mL/min |
| Column Temperature | : 50 °C |
| Detection | : Conductivity detector (CDD-10Avp) |
| Injection volume | : 10 μL |

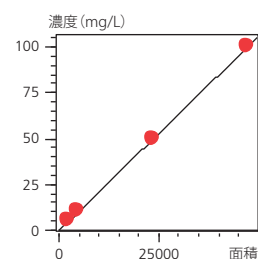
Table 6 対象成分の検量線濃度範囲と寄与率

| 化合物名 | 検量線濃度範囲 (mg/L) | 寄与率 (R^2) |
|-------|----------------|---------------|
| くらん酸 | 5-100 | 0.99944 |
| ピルビン酸 | 5-100 | 0.99999 |
| りんご酸 | 1-100 | 0.99997 |
| こはく酸 | 1-100 | 0.99997 |
| 乳酸 | 1-100 | 0.99992 |
| フマル酸 | 1-100 | 0.99994 |
| 酢酸 | 1-100 | 0.99995 |

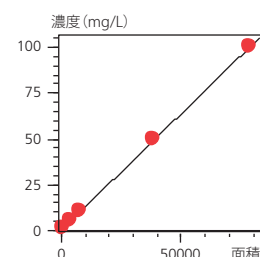
1. くらん酸



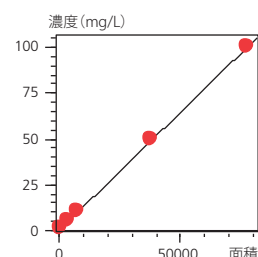
2. ピルビン酸



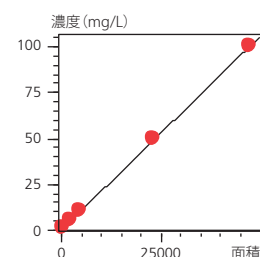
3. りんご酸



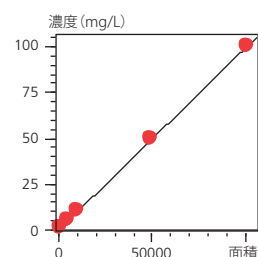
4. こはく酸



5. 乳酸



6. フマル酸



7. 酢酸

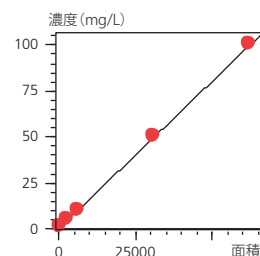


Fig. 11 対象成分の検量線

6. 結論

- 有機酸高速分析カラム Shim-pack Fast-OAは有機酸分析のサイクルタイムを短縮化します。
- pH緩衝化電気伝導度検出法と有機酸高速分析カラムを組み合わせることで、試料中の夾雑成分の影響を抑えて有機酸を選択的に検出することができます。
- 有機酸分析移動相試薬セットを使用することで、業務効率の向上につながります。