

Application News

No. L547

高速液体クロマトグラフィー

有機酸高速分析カラムShim-pack™ Fast-OA による発酵モニタリング

有機酸は食品中の呈味・香り成分として注目されるだけでなく、医薬品、化成品原料として利用されており、様々な分野で分析されています。HPLC による有機酸分析はイオン排除、イオン交換、逆相など、分離モードの選択肢が複数あるだけでなく、検出においても、UV 法、電気伝導度検出法などが用いられています。

イオン排除カラムとポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法は、試料由来のマトリクスの影響を抑制して有機酸を選択的に検出するため、よく用いられています。しかしながら分析時間の長さに課題があり、特に分析対象成分数の限られているバイオプロダクションの研究や腸内細菌叢分析においては分析時間の短縮が求められていました。また、発酵状態のモニタリングでは、培養を状況に応じて制御するために、微生物が代謝産物として生産する有機酸を迅速に定量することが必要とされています。

ここではイオン排除カラム Shim-pack Fast-OA を使用した発酵時の有機酸量の経時変化をモニタリングした事例を報告します。

M. Nakashima, K. Koterasawa

■ 標準試料の分析

Shim-pack Fast-OA はイオン排除モードで、酸性移動相条件下、各試料成分の pKa に準じた分離を行います。従来品である Shim-pack SCR-102H も同じ原理で有機酸を分離しますが、Shim-pack Fast-OA は官能基付与率をはじめとしたカラム設計を最適化することにより、従来よりも短い時間での有機酸の分離、溶出を実現しました。

表 1 に分析条件、図 1 に有機酸混合標準液 5 成分を分析したクロマトグラムを示します。10 分以内に酢酸の溶出が可能であることを確認しました。

図 2 には有機酸混合標準液 5 成分の溶出時間と各化合物の pKa を示しました。今回対象とした 5 成分については Shim-pack Fast-OA のイオン排除作用が効果的に働き、pKa の差に準じた分離が実現できていることが分かります。

表 1 分析条件

Column	: Shim-pack Fast-OA 2 column in series (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
Column temperature	: 30 °C
Detection	: Conductivity detector (CDD-10Avp)
Injection volume	: 10 μL

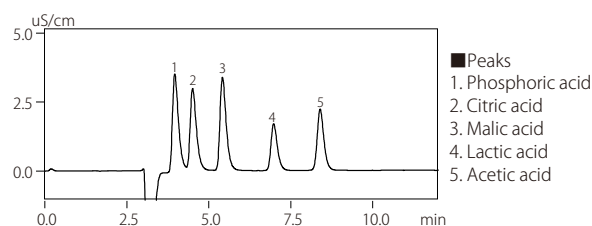


図 1 標準試料のクロマトグラム

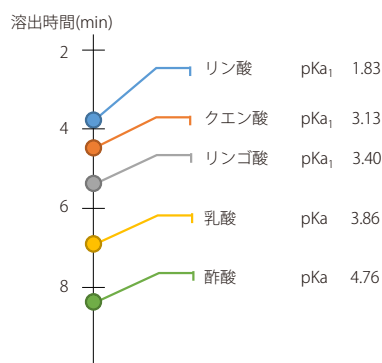


図 2 対象化合物の溶出時間と pKa (pKa 値は、生化学データブック、化学便覧基礎編より引用)

■ 直線性と再現性

各成分の有機酸について 10、50、100、500、1000 (mg/L) の濃度範囲における直線性寄与率と、検量線の最低濃度である 10 mg/L における繰り返し分析の面積再現性について評価しました。これらの結果を表 2 に示します。寄与率 (r²) は 0.9999 以上、ピーク面積の再現性はいずれも 1.5%RSD 以下と良好な結果が得られました。

表 2 直線性と面積再現性

	Linearity (r ²)	Area (%RSD)
Phosphoric acid	0.99994	0.981
Citric acid	0.99998	0.975
Malic acid	0.99999	0.777
Lactic acid	0.99997	1.322
Acetic acid	0.99999	1.190

■ 試料の前処理

市販のヨーグルトドリンクを除たんぱくと脱脂のために、5 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液（移動相）およびクロロホルムによって抽出した後、フィルターろ過を行い、HPLC 分析に供しました。標準試料を 50 mg/L になるようにヨーグルトに添加した試料を用いて、回収率の評価を行いました。図 3 に前処理プロトコルを示します。得られたクロマトグラムを図 4、回収率を表 3 に示します。pH 緩衝化法により、有機酸を選択的に検出したことにより、96~118% という良好な回収率が得られました。

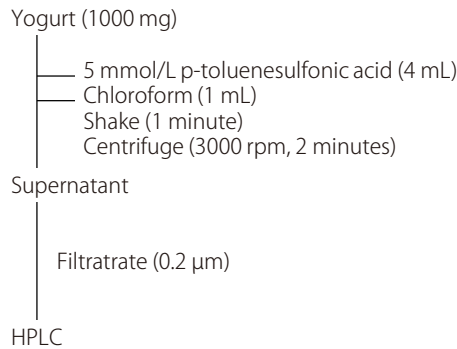


図 3 前処理プロトコル

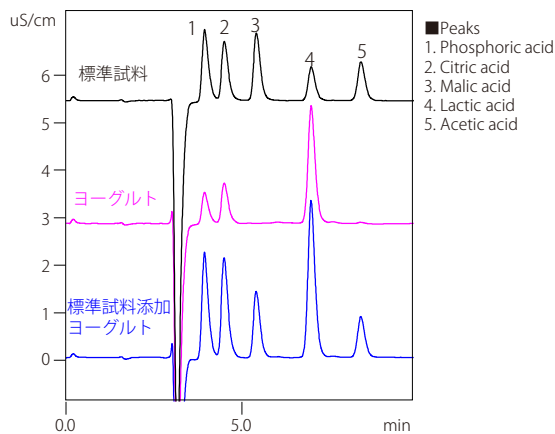


図 4 前処理済みヨーグルトのクロマトグラム

表 3 各成分の添加回収率

	Recovery (%)
Phosphoric acid	102.0
Citric acid	102.2
Malic acid	96.3
Lactic acid	117.1
Acetic acid	100.9

■ 発酵モニタリングの実施例

自家発酵ヨーグルトに含まれる主要な酸性物質であるリン酸、クエン酸、乳酸の経時変化について、評価した結果を図 5 に示します。

一般に、ヨーグルトは微生物が乳糖を代謝・分解して、乳酸を生産することで発酵が進み酸味を呈すると言われております。実際に、加温開始から 3.5 時間以降で乳酸が増加していく様子が確認できました。

このように微生物の生育環境（発酵食品や培地）に存在する有機酸をモニタリングすることで、微生物の代謝や発酵状態をモニタリングすることができます。

本法では分析時間が 12 分サイクルで、サンプリングから結果を確認するまで 20 分程度で行えるため、従来は困難であった詳細な発酵モニタリングやコントロールに貢献することができます。

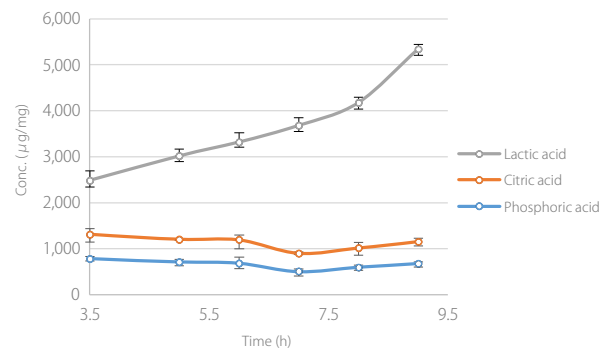


図 5 ヨーグルト中の酸の経時変化 (N=3)

■ まとめ

Shim-pack Fast-OA を用いてヨーグルトの分析を行った結果、主要有機酸を 12 分程度で確認することができました。有機酸の迅速な分析は多検体処理における繰り返し分析数の確保、状態に応じた迅速な発酵制御に有用であることが示唆されました。

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

初版発行：2019 年 8 月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。