

# Application News

## No. L490

高速液体クロマトグラフィー  
High Performance Liquid Chromatography

### ポストカラム pH 緩衝化有機酸分析システム による培地中の有機酸分析

Organic Acids Analysis of Medium with Post-Column pH Buffering Organic Acid Analysis System

近年、化石燃料に代わり、バイオマスを原料として新エネルギーや化学製品を製造するバイオプロダクションの研究が盛んになりつつあります。微生物の細胞を工場として考えるバイオプロダクションでは、糖類を代謝させることにより目的の化合物を生産する過程で、培地中に目的の化合物の他、ピルビン酸、乳酸、酢酸、ギ酸、コハク酸などの有機酸を代謝産物として生産します。これらの有機酸を正確に定性・定量することによって、投入した炭素源がどこに流れているのかなど、細胞内の代謝状態を的確に把握できます。微生物の細胞による目的の化合物の生産性を向上させるため、培地の分析によって得られた代謝産物の種類や量の結果に基づいて、微生物がもつ遺伝子のうち、改変すべきターゲットを探索することができます。そのため、培地中の有機酸の分析はバイオプロダクションの研究を進めるのに重要なファクターとなります。

有機酸の分析には紫外吸光度検出器が用いられることもありますが、複雑なマトリクスである培地を分析する際には夾雑成分が対象成分と重なるリスクがあります。

ここでは、電気伝導度検出器を用いたポストカラム緩衝化とデュアルカラムオープン併用することにより、分離を改善しつつ、選択性の高い検出法によって、培地中の有機酸を分析した事例をご紹介します。

Y. Hirao

#### デュアルカラムオープンシステムによる ポストカラム緩衝化電気伝導度検出法

Post-Column pH Buffered Electric Conductivity Detection with Dual Column-Oven System

有機酸の分離には、酸性水溶液によるイオン排除クロマトグラフィーを用いますが、イオン量の変化をモニターする電気伝導度検出器では、移動相由来のバックグラウンドノイズの増大および有機酸の解離抑制により、高感度検出は困難です。本システムでは、カラムによって有機酸を分離した後、緩衝液との混合により移動相 pH を中性付近にすることで、有機酸の解離により検出感度が向上します。

また、アプリケーションニュース No. L442 では、2台のカラムオープンによって、分離不十分な有機酸の分離を改善した例をご紹介します。この方法を用いることにより、バイオプロダクションの対象となる有機酸の分離が改善し、より正確に定性・定量することが可能になります。

UV 検出による有機酸分析では、化合物がもつ二重結合の数により吸光係数に差が生じるため、同じ濃度であってもピーク強度が大きく異なります。そのため、試料の希釈倍率を決定することが困難になることがあります。電気伝導度検出による有機酸分析ではピーク強度が一様になります。Fig. 1 に UV 検出および電気伝導度検出による標準溶液のクロマトグラムの比較を示します。UV 検出での分析条件は Table 1 に、電気伝導度検出による分析条件は Table 2 に示します。

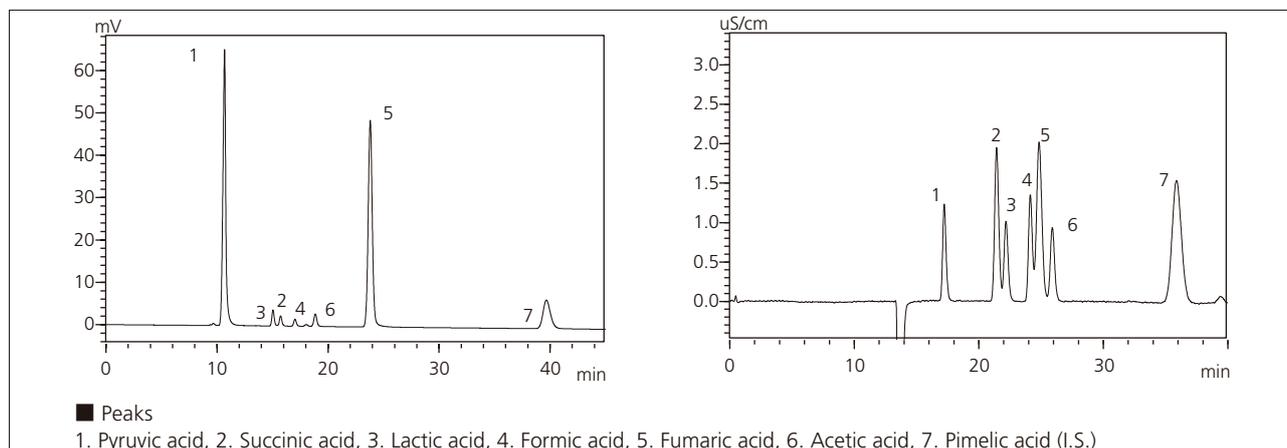


Fig. 1 有機酸標準溶液クロマトグラムの比較  
左：紫外吸光度検出 右：電気伝導度検出  
Comparing Chromatograms of Organic Acid Standard Solution  
Left: UV detector Right: Conductivity detector

## ■ バイオマス分析における UV 検出と電気伝導度検出の比較

### Comparing UV Detection with Electro Conductivity Detection for Biomass Analysis

Table 1 に記す分析条件に従い、Fig. 2 に培地を分析した結果を示します。分析した培地にはポリペプトンや酵母抽出液などが含まれているため、紫外吸光度検出では、対象の有機酸以外の成分が検出されており、分離条件によっては夾雑成分と目的成分との分離が困難になるとともにベースラインの安定性が悪い場合があります。Fig. 3 では、同じ培地を Table 2 に記す分析条件に従い、ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出で分析した結果を示します。本分析法では、高い選択性により夾雑の影響をほとんど受けずに有機酸の成分が検出されていることがわかります。

Table 1 UV 検出での分析条件  
Analytical Conditions for UV Detector

Column	: Ion Exclusion Column
Mobile Phase	: 0.75 mmol/L Sulfuric Acid
Flow Rate of Mobile Phase	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 10 µL
Detection	: UV 205 nm

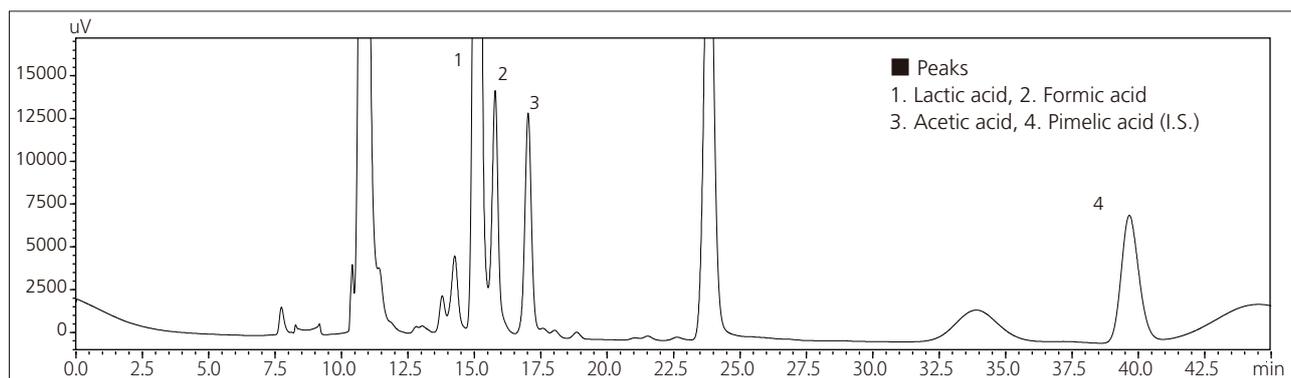


Fig. 2 紫外吸光度検出による培地のクロマトグラム  
Chromatogram of Medium with UV Detector

Table 2 ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出での分析条件  
Analytical Conditions for Conductivity Detector

Column	: Shim-pack SCR-102H, 2 columns in series (300 mL. × 8.0 mmI.D., 7 µm)
Mobile Phase	: 5 mmol/L <i>p</i> -Toluenesulfonic acid
pH Buffering Solution	: 5 mmol/L <i>p</i> -Toluenesulfonic acid, 20 mmol/L Bis-Tris, 0.1 mmol/L EDTA-4H
Flow Rate of Mobile Phase	: 0.8 mL/min
Flow Rate of pH Buffering Solution	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 48 °C, 25 °C
Injection Vol.	: 10 µL
Detection	: Conductivity Detector

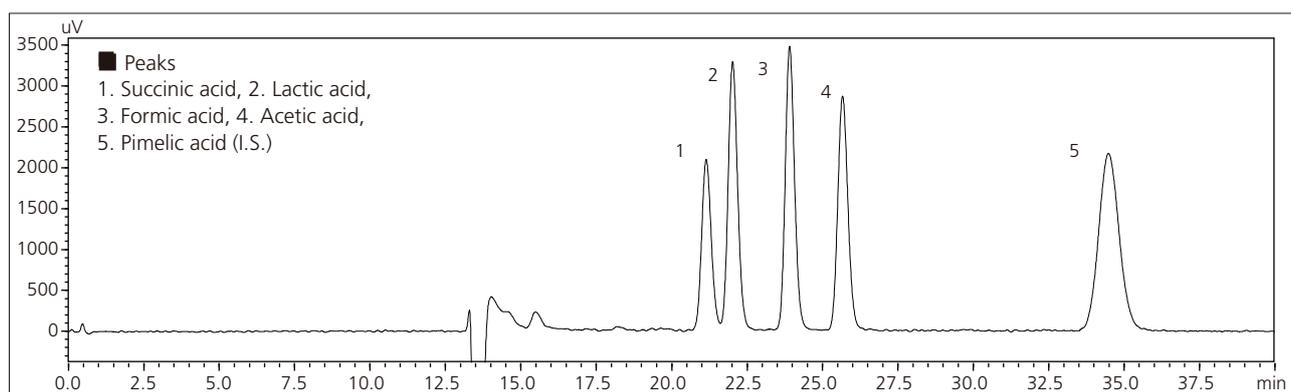


Fig. 3 電気伝導度検出による培地のクロマトグラム  
Chromatogram of Medium with Conductivity Detector

<謝辞>

本アプリケーションニュースは、独立行政法人理化学研究所 細胞生産研究チーム 白井智量先生との共同研究により作成いたしました。深く感謝申し上げます。

**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：2015年2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>

会員制情報サービス「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。