

# Application News

## No. L548

高速液体クロマトグラフィー

### Nexera™デュアルインジェクションシステムによる発酵過程のモニタリング

微生物が各種の物質を分解し有用な物質を生産することを発酵といいます。発酵は、食品だけでなく、近年は工業分野などでも広く利用されています。発酵過程の解明や条件の最適化のため、有機酸、糖、アミノ酸など複数の化合物群を測定して多角的な解析が行われています。HPLCの場合、それぞれの化合物群に適した分離モードや検出方法が異なるため、これらを個別に分析する必要がありました。

本稿では、2種の分析を1システムで同時に行うデュアルインジェクションシステムで発酵過程をモニタリングした例をご紹介します。

K. Koterasawa

#### デュアルインジェクションシステムの概要

Nexera のオートサンプラーSIL-40 シリーズのオプションであるデュアルインジェクション機能では、独立した2つの流路それぞれにサンプルを注入し、異なる条件の2系統の分析を同時に行うことができます。また、本システムで得られた2つの結果は1つのデータファイルに集約され、サンプルに対するデータのトレーサビリティを確保します。さらに、メソッドファイル、バッチファイルも1つに集約されるため、分析操作を容易にします。

図1に、イオン排除カラム、ポストカラム pH 緩衝化法、電気伝導度検出器を用いた有機酸分析と、配位子交換カラム、示差屈折率検出器を用いた糖分析の2つの分析をデュアルインジェクションシステムにて行うための流路図を示します。有機酸分析と糖分析ではカラム温度条件が異なるため、カラムオープン CTO-40S を2台用いてカラムを別々に温調しました。

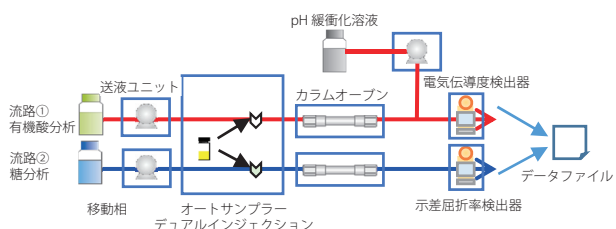


図1 デュアルインジェクションの流路図

#### 有機酸の分析

分析流路①では有機酸を分析しました。図2に、有機酸(クエン酸、リンゴ酸、乳酸、ギ酸、酢酸)の混合標準溶液(各100 mg/L)のクロマトグラムを、表1に分析条件を示します。

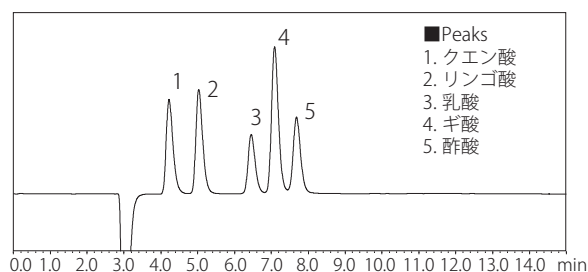


図2 有機酸混合標準溶液のクロマトグラム

表1 有機酸の分析条件

カラム	: Shim-pack™ Fast-OA (100 mm L×7.8 mm I.D., 5 μm) (2本使用)
ガードカラム	: Shim-pack Fast-OA (G) (10 mm L×4.0 mm I.D., 12 μm)
移動相流量	: 0.8 mL/min
pH 緩衝液流量	: 0.8 mL/min
移動相	: 5.0 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸水溶液
pH 緩衝液	: 5.0 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸 20 mmol/L Bis-Tris, 0.1 mmol/L EDTA 混合水溶液
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 10 μL
検出器	: 電気伝導度検出器

Shim-pack Fast-OA とポストカラム pH 緩衝化法を用いた分析の詳細については、テクニカルレポート「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 (C190-0489)」をご参照ください。

## 糖の分析

分析流路②では糖を分析しました。図3に、糖（グルコース、フルクトース、マンノース、ラクトース）の混合標準溶液（各 1000 mg/L）のクロマトグラムを、表2に分析条件を示します。

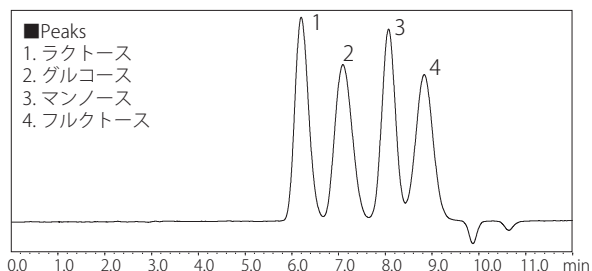


図3 糖混合標準溶液のクロマトグラム

表2 糖の分析条件

カラム	: Shim-pack SCR-101C (300 mm L×7.9 mm I.D., 10 μm)
ガードカラム	: Shim-pack ガードカラム SCR (C) (50 mm L×4 mm I.D., 10 μm)
流量	: 1.0 mL/min
移動相	: 水
カラム温度	: 80 °C
注入量	: 10 μL
検出器	: 示差屈折率検出器

## 再現性

表3に有機酸混合標準溶液（各 200 mg/L）、表4に糖混合標準溶液（各 1000 mg/L）の6回繰り返し分析における保持時間と面積値の結果をそれぞれ示します。いずれの成分においても、保持時間、面積ともに相対標準偏差 1%以下の結果が得られました。

表3 有機酸標準溶液分析結果 (n=6)

化合物名	保持時間 平均 (分)	保持時間 %RSD	面積値 %RSD
クエン酸	4.21	0.023	0.25
リンゴ酸	5.02	0.020	0.07
乳酸	6.44	0.018	0.39
ギ酸	7.08	0.015	0.34
酢酸	7.67	0.013	0.53

表4 糖標準溶液分析結果 (n=6)

化合物名	保持時間 平均 (分)	保持時間 %RSD	面積値 %RSD
ラクトース	6.20	0.013	0.08
グルコース	7.10	0.055	0.09
マンノース	8.07	0.010	0.13
フルクトース	8.83	0.008	0.11

## 検量線

図4に有機酸の検量線を、表5に検量線の濃度範囲と寄与率を示します。また、図5に糖の検量線を、表6に検量線の濃度範囲と寄与率を示します。

有機酸5成分、糖4成分について、寄与率  $R^2=0.9998$  以上と良好な直線性が得られました。

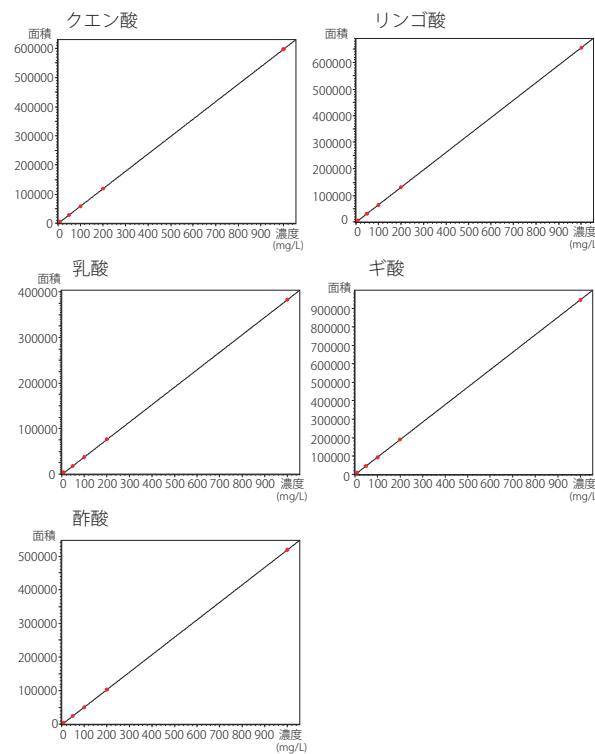


図4 有機酸の検量線

表5 有機酸の検量範囲と寄与率 ( $R^2$ )

化合物名	定量範囲 (mg/L)	$R^2$
クエン酸	10-1000	0.9999
リンゴ酸	10-1000	0.9999
乳酸	10-1000	0.9999
ギ酸	10-1000	0.9999
酢酸	10-1000	0.9999

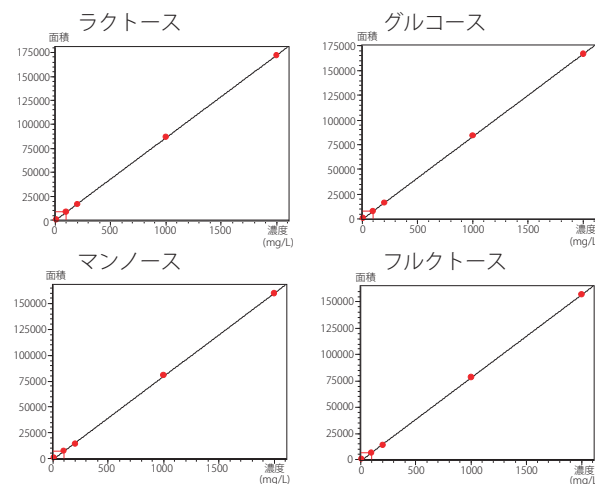


図5 糖の検量線

表6 有機酸の検量範囲と寄与率 ( $R^2$ )

化合物名	定量範囲 (mg/L)	$R^2$
ラクトース	10-2000	0.9999
グルコース	10-2000	0.9999
マンノース	10-2000	0.9998
フルクトース	10-2000	0.9998

## ■ キャリーオーバーの評価

有機酸（クエン酸、乳酸）、糖（ラクトース）について、キャリーオーバーを評価しました。オートサンプラのリンズとして、洗浄液に水を用いてニードル内外洗浄を行いました。

図6に有機酸のキャリーオーバーの評価結果、図7に糖のキャリーオーバーの評価結果を示します。キャリーオーバーは、高濃度の標準溶液に続いてブランク試料を注入し、検出された対象成分を定量計算して、高濃度試料の濃度との比（百分率）として算出しました。クエン酸では0.0055%、乳酸では0.0069%、ラクトースでは0.0098%と充分小さく、定量に影響を及ぼさないことが確認されました。

黒線：100 g/Lクエン酸、乳酸混合標準水溶液  
赤線：ブランク

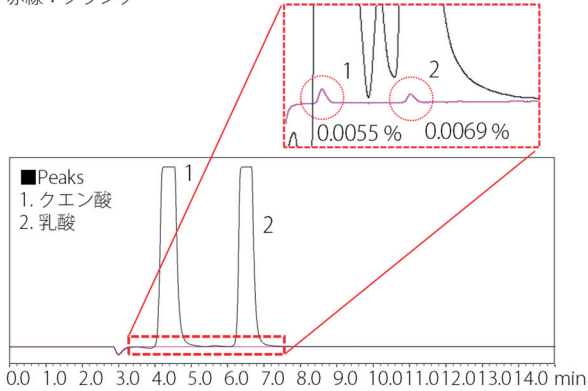


図6 クエン酸、乳酸のキャリーオーバーの評価

黒線：20 g/Lラクトース水溶液  
赤線：ブランク

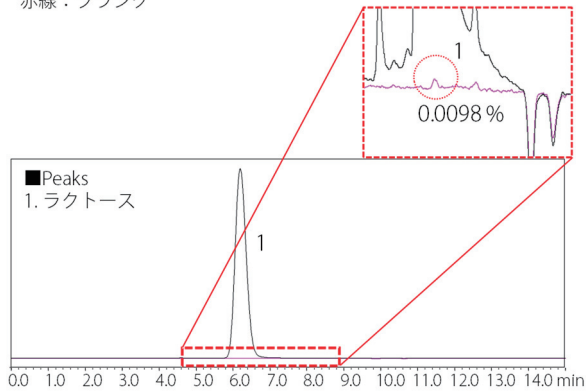


図7 ラクトースのキャリーオーバーの評価

## ■ 試料の前処理

試料は、牛乳にヨーグルトを添加したものを40℃で市販のヨーグルト製造機で発酵させ、開始から一定時間毎にサンプリングしました。前処理法は以下のとおりです。

- (1) ヨーグルト1gを秤量し、5 mmol/L *p*-トルエンスルホン酸水溶液を4 mL、クロロホルム1 mLを加えました。
- (2) 1分間振盪した後、10000 rpmで1分間遠心分離しました。
- (3) 上澄み液を回収し、0.45 μm細孔のフィルターでろ過しました。
- (4) ろ液を純水で10倍希釈し分析試料としました。

## ■ ヨーグルトの分析

本稿では、一定時間（0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0、8.5時間）経過した試料を分析しました。

図8に発酵開始後3.5時間のサンプルの有機酸分析のクロマトグラムを、図9に同サンプルの糖分析のクロマトグラムを示します。有機酸としてクエン酸、乳酸、糖としてラクトースが検出されました。

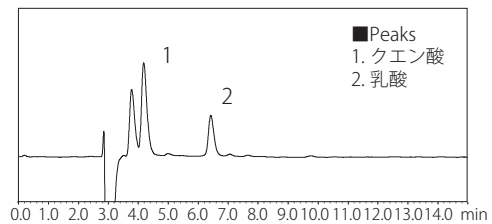


図8 発酵時間3.5時間のヨーグルト中の有機酸分析のクロマトグラム

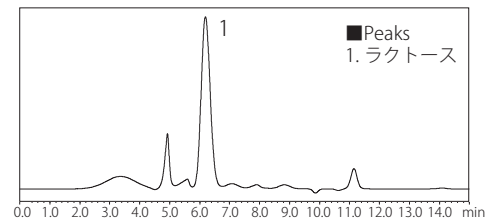


図9 発酵時間3.5時間のヨーグルト中の糖分析のクロマトグラム

## ■ ヨーグルトの回収率評価

3.5 時間経過後のサンプルを用いて有機酸、糖を添加し回収率を評価しました。前処理操作 (1) においてヨーグルト 1 g を秤量し、5 mmol/L *p*-トルエンスルホン酸水溶液を 2.6 mL、400 mg/L 有機酸混合水溶液 0.7 mL、2000 mg/L 糖混合水溶液 0.7 mL、クロロホルム 1 mL を加えました。図 10 に有機酸の標準添加有無のクロマトグラム、表 7 に有機酸の回収率、図 11 に糖の標準添加有無のクロマトグラム、表 8 に糖の回収率を示します。有機酸、糖ともに 94.6-101.8% という良好な回収率が得られました。

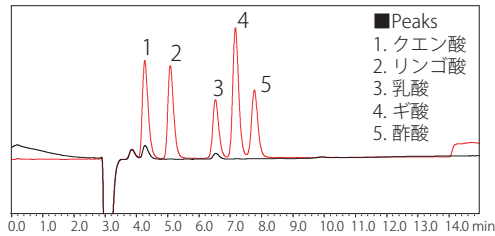


図 10 有機酸のクロマトグラム  
(赤：標準添加有り、黒：標準添加無し)

表 7 有機酸の添加有無の定量値と回収率  
(添加量：前処理後の濃度換算で 56 mg/L)

化合物名	添加有り 濃度 (mg/L)	添加無し 濃度 (mg/L)	回収率 (%)
クエン酸	65.9	10.0	99.8
リンゴ酸	57.0	未検出	101.8
乳酸	61.4	8.4	94.6
ギ酸	56.4	未検出	100.6
酢酸	56.1	未検出	100.3

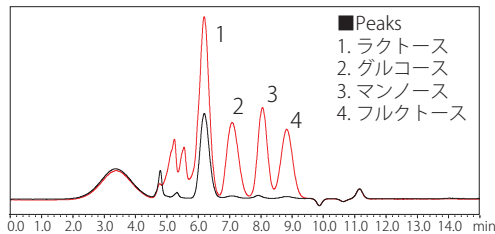


図 11 糖のクロマトグラム  
(赤：標準添加有り、黒：標準添加無し)

表 8 糖の添加有無の定量値と回収率  
(添加量：前処理後の濃度換算で 280 mg/L)

化合物名	添加有り 濃度 (mg/L)	添加無し 濃度 (mg/L)	回収率 (%)
ラクトース	544.0	257.1	102.4
グルコース	282.4	未検出	100.9
マンノース	301.5	未検出	107.7
フルクトース	298.6	未検出	106.6

## ■ ヨーグルトの発酵の経時変化評価

一定時間 (0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0、8.5 時間) 経過したサンプルを分析し、有機酸、糖の含有量の経時変化を確認しました。

図 12 に発酵時間毎の有機酸の含有量の変化を、図 13 に糖の含有量の変化を示します。この結果から、発酵が進むにつれて、ラクトースが分解され、乳酸が生成されていることが確認されました。

なお、ここで示す濃度は、ヨーグルト原液に換算した濃度です。

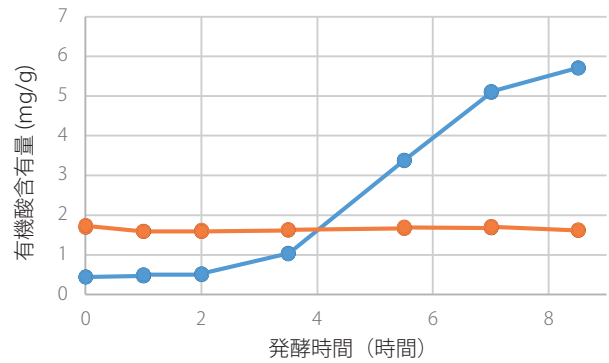


図 12 ヨーグルト中の有機酸の含有量  
(青：乳酸、橙：クエン酸)

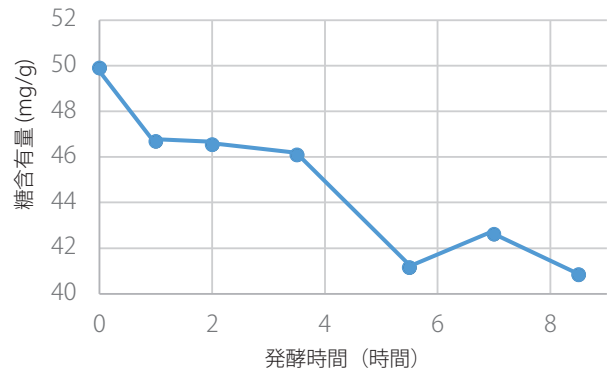


図 13 ヨーグルト中の糖の含有量

## ■ まとめ

Nexera シリーズのデュアルインジェクションシステムを用いることにより、有機酸分析と糖分析の 2 系統の分析を 1 システムで同時に行うことができました。

このシステムを用いて、ヨーグルト発酵中の有機酸、糖の含有量の経時変化を評価し、発酵の進行具合のモニタリングを行うことができました。デュアルインジェクションシステムは、複数の化合物群を同時に分析・解析することで、多角的な解析を容易に行うことが可能となります。

Nexera および 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。