

Application Note

No. 61

有機酸

多様な有機酸分析手法とその分析アプリケーション

平尾美子*1○、中島みのり、武守佑典、東由衣、近藤友明、服部考成、猪鼻祐介



Contents

1. はじめに
2. HPLC による有機酸の分析
 - 2-1 逆相クロマトグラフィー — UV 検出法
 - 2-2 イオン排除モードクロマトグラフィー — 電気伝導度検出法
 - 2-3 イオンクロマトグラフィー
3. LC-MS による有機酸の分析
4. GC および GC/MS による有機酸の分析
5. 実試料の分析
 - 5-1 医薬品の有機酸分析例
 - 5-2 ライフサイエンス関係の有機酸分析例
 - 5-3 エネルギー関係の有機酸分析例
 - 5-4 環境関係の有機酸分析例
 - 5-5 食品中の有機酸分析例
 - 5-6 メタボロミックスの網羅的な分析例
6. まとめ

*1 分析計測事業部
○ 責任著者

1. はじめに

有機酸は酒類や発酵食品の風味の成分、医薬品のカウンターイオンの対象成分や廃水中の悪臭成分として古くから分析されてきました。近年、脱化石燃料による持続可能な社会の実現を目指した政策が増えている中で、バイオエタノールの効率的な製造プロセスや人工光合成といった新しいエネルギーの技術に関連した研究が活発化しています。これらの技術によって産生される有機酸はこれらの技術の効率化を向上させるため、モニタリングが必要になります。また、これまで化石燃料がプラスチック製品やフィルム製品の原材料として使用されていましたが、バイオマスの発酵過程から産出されるコハク酸やプロピオン酸といった有機酸を中間体として高分子製品の原材料に置き換えようとする試みも増えてきています。その他、機能性成分として短鎖脂肪酸を産出する腸内細菌の研究や、有機酸をはじめとした一次代謝物の解析により付加価値の高い食品および飲料の製品開発など、有機酸のモニターが必要となる場面は多岐に渡ります。

有機酸の分析は、古くから分離分析が用いられてきましたが、それぞれの分析手法に特徴があります。例えば、GC、GC/MS については、通常、液体試料を気化室で気化しカラムに導入しますが、そのほかにバイアルに封入された試料の気相部分（ヘッドスペース）のみをカラムに導入する手法などがあります。また、HPLC については、分離モードと検出法の組合せにより、多様な分析手法があります。近年では質量分析装置との組み合わせにより、有機酸とその他の成分との一斉分析が可能になりました。この記事では、分離分析をつかった有機酸分析手法の紹介と分野別でのアプリケーションをご紹介します。表 1 に、各装置による有機酸分析の特徴のまとめを示します。

表 1 分析手法の分類

装置	分析時の 主な試料形態	誘導体化の 有無	検出選択性	網羅性
HPLC	・水 ・水溶性溶媒	無	CDD：○ UV：×	×
LC-MS			◎	○
GC	・溶媒 ・気体 (※前処理装置併用)	有	×	△
GC-MS			◎	◎

2. HPLC による有機酸分析

有機酸は極性の高い性質の化合物です。そのため汎用的な分離モードである逆相クロマトグラフィーを用いる場合には、水溶液系のための移動相を選択します。多成分の有機酸を分離するには、イオン性化合物の分離選択性が高いイオン排除クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーが使用されます。

有機酸を検出するには、吸光度（UV）検出や電気伝導度検出、MS 検出が用いられます。UV 検出や電気伝導度検出を使用する場合、夾雑成分や移動相由来のバックグラウンドの影響を受けるため、複雑なマトリクスをもつ試料を分析する場合、信頼性のある分析結果を得ることは困難です。この対策法として、ポストカラム法やサプレッサカートリッジなどの除去処理装置の適用があげられます。

一般的には、①逆相クロマトグラフィー – UV 検出法、②ポストカラム法を用いたイオン排除クロマトグラフィー（ポストカラム電気伝導度検出法）、③イオン交換クロマトグラフィー電気伝導度検出法（イオンクロマトグラフィー）の 3 つがあげられます。この章では、HPLC を用いた 3 種類の方法による有機酸分析例について紹介します。

2-1. 逆相クロマトグラフィー UV 検出法

逆相クロマトグラフィーと UV 検出法を組み合わせた分析手法は、汎用的な HPLC を用いて有機酸を分析できる手法です。有機酸はカルボキシル基を有するため、210 nm 付近の短波長領域に吸収を持ちます。図 1 にくえん酸の UV 吸収スペクトルを示します。短波長領域では、多くの有機化合物が UV 吸収を持つ官能基があるため、夾雑成分のピークによる妨害が生じやすい検出方法ですが、夾雑成分が比較的少ない分析には適した検出法です。

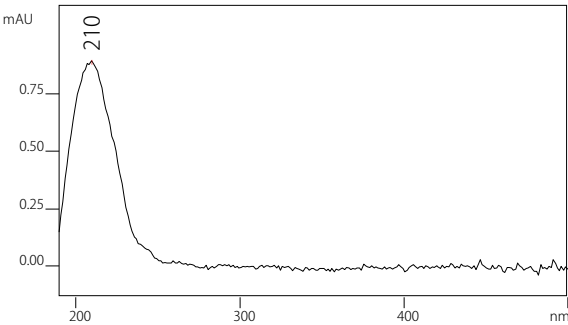


図 1 くえん酸の UV 吸収スペクトル

また、逆相クロマトグラフィーは、疎水性相互作用の差異により化合物を分離するモードで、HPLC 分析では最も汎用性が高い分離方法です。有機酸のように親水性の高い化合物の分析においては、有機溶媒を使用せず水溶液系移動相のみを使用し、固定相に保持させます。逆相クロマトグラフィーのカラムには高速分析用製品ラインナップが多く、短時間での有機酸分析が可能です。図 2 に清涼飲料水中の有機酸の高速分析例を示します。この分析の詳細内容は Application News No.L360「高速高分離分析の応用（その 10）有機酸の分析」をご覧ください。

アプリケーションニュースのダウンロードはこちら

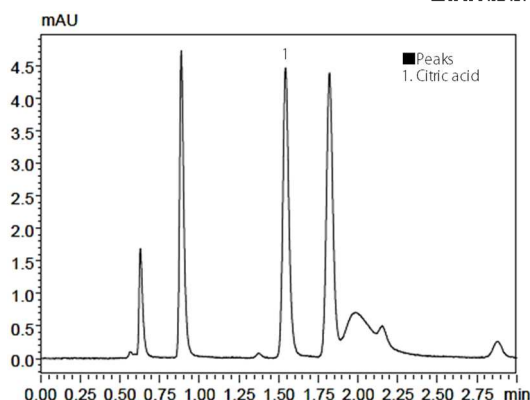


図 2 清涼飲料水中有機酸の高速分析

従来の逆相クロマトグラフィーのカラムでは、水溶液系移動相のみを長時間通液することにより生じる保持の低下、再現性の低下という問題がありましたが、そのような移動相の使用でも長期にわたり安定した保持を実現するカラムが開発されています。図 3 に逆相カラム：Shim-pack™ G シリーズの性能比較を示します。Shim-pack GIST C18-AQ (図 4) は他の G シリーズの ODS カラムと比べて、保持能・不活性度が高く、水溶液系移動相条件下で安定した保持時間再現性を示し、有機酸の高速高分離が可能です。図 5 に Shim-pack GIST C18-AQ を用いてワイン中の有機酸を高速分析した例を示します。

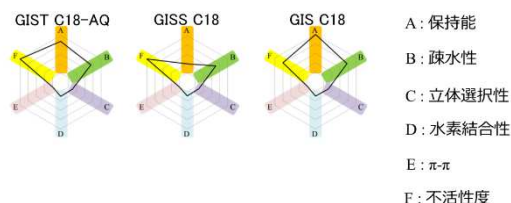


図 3 Shim-pack G シリーズの性能比較

Shim-pack GIST シリーズのサイトはこちら



図 4 Shim-pack™ GIST C18-AQ

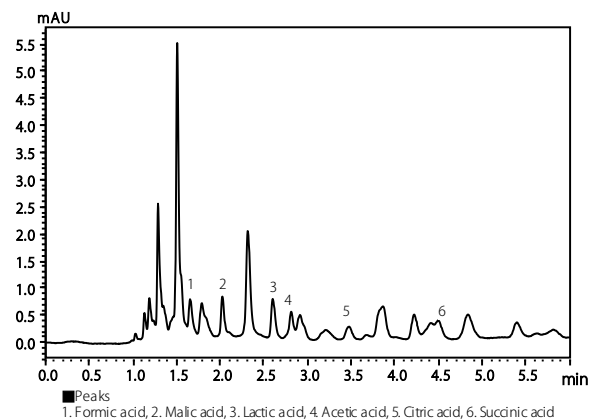


図 5 Shim-pack GIST C18-AQ を用いた赤ワイン中の有機酸の分析

分析条件

分離カラム	Shim-pack GIST C18-AQ (250 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
移動相	10 mmol/L リン酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH2.6)
流量	1.0 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	4 μL
検出	紫外吸光度検出器 (210 nm)

Nexera シリーズのサイトはこちら



Nexera
Ultra High Performance Liquid Chromatograph



超高速液体クロマトグラフ
Nexera™ シリーズ

2-2. イオン排除クロマトグラフィー 電気伝導度検出法

この方式は、島津 LC 応用システム製品ラインナップの一つである LC 有機酸分析システムとして提供している分析手法です。図 6 に島津 LC 有機酸分析システムの原理を示します。試料中の有機酸は、イオン排除クロマトグラフィーのカラムにより分離された後、連続的に添加される緩衝液によりイオン化され、電気伝導度検出器により高感度に検出されます。この手法では、試料中のイオン性の成分のみが検出されるため、夾雑ピークの妨害の影響をほとんど受けず高い選択性のある有機酸分析が可能になります。

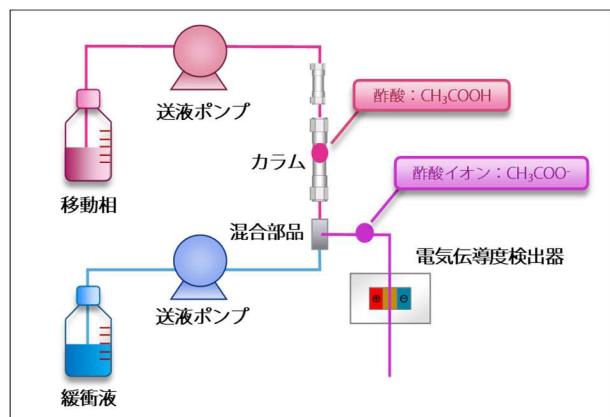


図 6 島津 LC 有機酸分析システムの原理

HPLC による有機酸分析においては、分離のファーストチョイスとして、イオン排除クロマトグラフィーが用いられています。この分離モードは、有機酸のような弱酸の分離に対して高い選択性があります。図 7 にイオン排除クロマトグラフィーの原理を示します。固定相（H 型イオン交換基）の負電荷により、強酸は大きな静電的排除（イオン反発）を受け、充てん剤細孔内部に浸透できずにカラムを素通りします。一方、有機酸のような弱酸は pKa の差により、イオン反発の大きさが異なることにより、細孔内部への浸透する度合いに違いが生じるため、カラムからの溶出時間に差が生じます。Shim-pack シリーズの製品ラインナップにおけるイオン排除クロマトグラフィーのカラムは、高分離分析に適した Shim-pack SCR-102H や高速分析に適した Shim-pack Fast-OA が該当します。

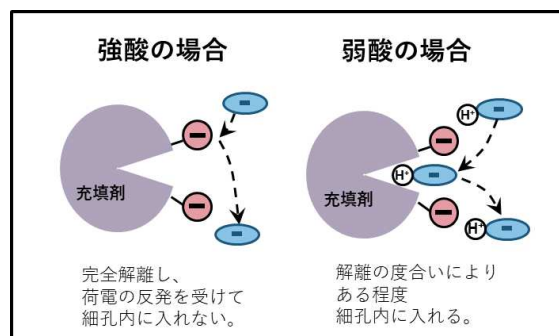


図 7 イオン排除モードの原理

イオン排除クロマトグラフィーによる有機酸分析における移動相には、*p*-トルエンスルホン酸や過塩素酸といった酸性水溶液を用います。このような酸性の移動相条件下では、有機酸のような弱酸はイオン化が抑制された状態かつ移動相由来のバックグラウンド電気伝導度が高い状態にあるため、電気伝導度検出器では十分な感度が得られません。そこで有機酸をカラムで分離した後に、pH 緩衝液を連続的に加えて混合することによって、移動相の pH を中性付近にすると、有機酸のイオン化が促進され、電気伝導度検出器での検出感度が大幅に向上します。

図 8 に酢酸を例にして移動相 pH と解離度の関係を、図 9 に pH 緩衝化の有無を比較したクロマトグラムを示します。移動相として用いた *p*-トルエンスルホン酸水溶液の pH (約 3) では酢酸はほとんど解離していないことがわかります。

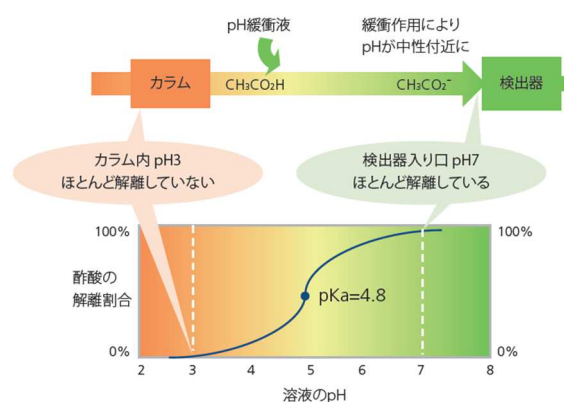


図 8 pH 緩衝化法における有機酸の状態

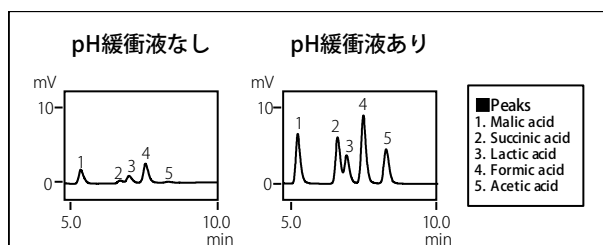


図 9 pH 緩衝化による感度向上

Nexera 有機酸分析システム
のサイトはこちら



Nexera™ 有機酸分析システム

イオン排除モードにおいてはグラジエント溶離は適さないため、分離能を向上させるには、複数本カラムを連結したり、カラム温度を変更するといった方法があります。図10に同一条件下でカラムを複数本接続した場合のクロマトグラムを示します。カラムの連結により、分離が改善されることが分かります。詳細な内容は Technical Report C190-0489「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」をご覧ください。

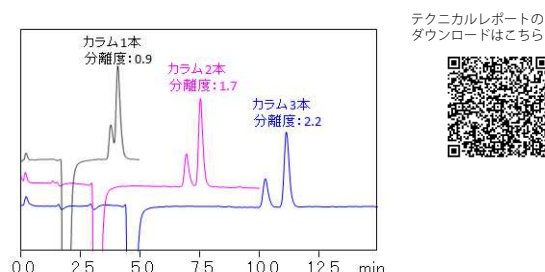


図10 Shim-pack Fast-OA の複数本接続の効果

温度を調節することによる保持の改善例を図11(左図)に示します。イオン性の化合物は存在下の環境温度により解離状態が変化するため、カラム温度を調節することで対象となる有機酸によっては、最適な分離を得られることがあります。対象成分が多く、カラムを複数本連結しても分離が不十分な場合は、連結しているカラムを個別に温調することで、さらなる分離改善の可能性があります。図11(右)に異なるカラム温度での有機酸分離の例を示します。詳細な内容は Application News No.L442A「有機酸分析においてカラム温度が分離に与える影響」をご覧ください。

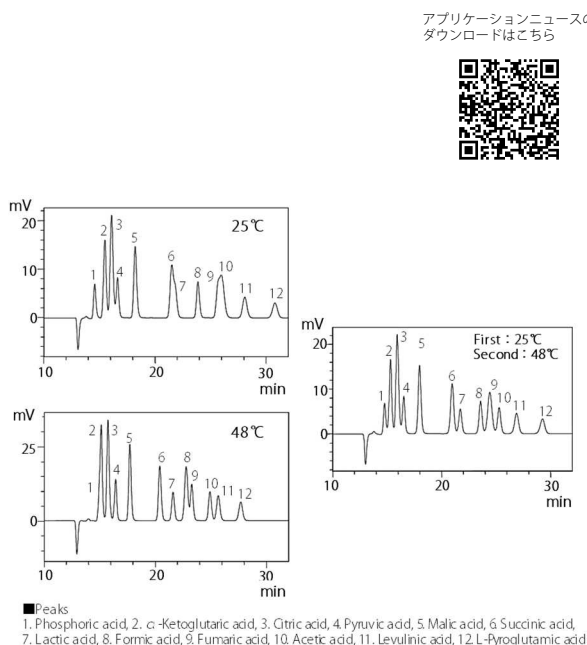


図11 カラム温度の変更による保持の改善例
(Shim-pack SCR-102H 2本使用時)

2-3. イオンクロマトグラフィー

イオンクロマトグラフィーは、イオン性化合物を測定するのに特化した分析手法で、主に分離にはイオン交換クロマトグラフィー、検出には電気伝導度検出器を組み合わせています。イオンクロマトグラフィーは主に無機イオンの分析に用いられますが、有機酸もまたイオン性の化合物であるため、イオンクロマトグラフィーによる測定が可能です。

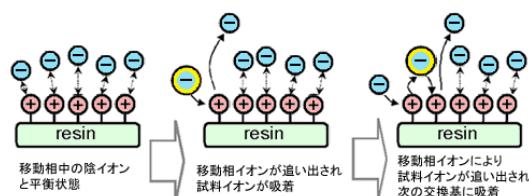


図12 陰イオン交換クロマトグラフィーの原理

図12に陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離の原理を示します。陰イオン交換クロマトグラフィーでの分離においては、試料中の陰イオンと移動相中の陰イオンが交換して固定相の陽イオンに保持されます。固定相から陰イオンを脱離させるため、陰イオンを含む移動相を用います。つまり、固定相の陽イオンは移動相中の陰イオン有機酸イオン（陰イオン）で奪い合って分離するモードと言えます。この分離モードを適用した有機酸分析では、試料中の有機酸は移動相内で解離状態に変化しており、陰イオン状態の有機酸が固定相に保持されます。イオン交換クロマトグラフィーの分離には、酸や塩を添加した水溶液を移動相として用います。

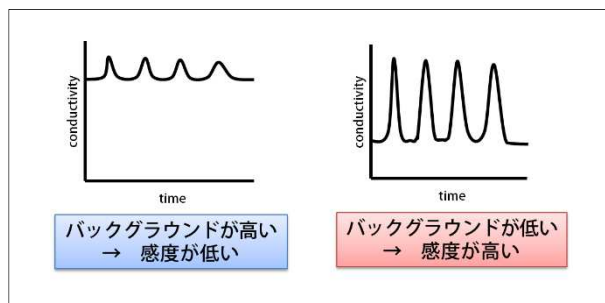


図13 電気伝導度検出器使用時のバックグラウンドの影響

電気伝導度検出器の原理は、水溶液中にイオンが存在することによって、電気が流れることを利用しているため、検出器へ流入する移動相と試料のイオン濃度の差により生じる電気伝導度の変化を検出します。試料中、移動相中のすべてのイオンが電気伝導度の和として検出されるため、移動相由来のバックグラウンド電気伝導度が高いと測定対象の成分の感度が低下します(図13)。このため、移動相中のイオンの除去処理装置(サプレッサ方式)やバックグラウンドが小さい移動相(ノンサプレッサ方式)を適用した分析手法があります。なお、イオンクロマトグラフィーでは、有機酸と無機イオンとの同時検出が可能です。

2-3-1. サプレッサ方式

イオン交換クロマトグラフィーで有機酸を分離するために、溶離液は炭酸ナトリウム水溶液や水酸化カリウム水溶液など、pH7 以上の溶離液を用います。このような溶離液中には、ナトリウムイオンやカリウムイオンのように導電性の高いイオンが含まれています。サプレッサはこのようなイオンを除去するために用いられます。図 14 にイオンクロマトグラフ HIC-ESP のサプレッサ (ICDS™-40A) の原理を示します。

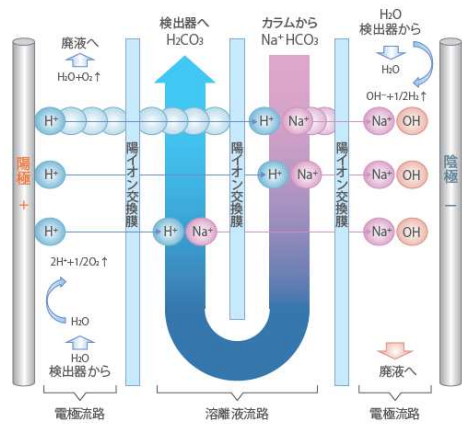


図 14 サプレッサ ICDS-40A の原理

サプレッサ通過後の溶離液には、溶存していたナトリウムイオンなどのイオンが除去され、水素イオンに置換されることにより、バックグラウンド電気伝導度が低下します。有機酸はイオン化しているため、電気伝導度検出器で高感度にイオンが検出されます。

なお、電気伝導度検出器を用いて、様々な有機酸を一斉分析したい場合には有機酸分析システム、感度を優先する場合にはサプレッサ方式イオンクロマトグラフといったように目的に応じて最適な分析手法を選択するのが望ましいです。

図 15 に陰イオン分析用カラム Shim-pack IC-SA3 を用いたジカルボン酸の分離例を示します。

分析条件	
分離カラム	: Shim-pack IC-SA3 (250 mm × 4.0 mm I.D., 5 μm)
移動相	: 3.6 mmol/L 炭酸ナトリウム
流量	: 0.8 mL/min
カラム温度	: 45 °C
注入量	: 50 μL
検出	: 電気伝導度検出器 (サプレッサ方式)

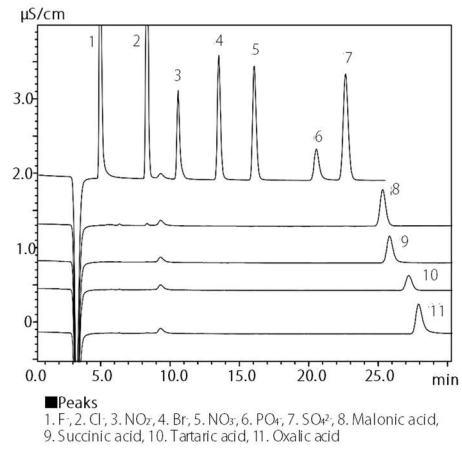


図 15 ジカルボン酸の分離例 (サプレッサ方式)

2-3-2. ノンサプレッサ方式

サプレッサを使用せず、イオン交換クロマトグラフィーでイオン化合物を分離するには、電荷密度の小さい酸を使用することにより、バックグラウンド電気伝導度を極力抑えます。

図 16 に陰イオン分析用カラム Shim-pack IC-A3 を用いたジカルボン酸の分離例を示します。ノンサプレッサとサプレッサ方式では、感度の違いだけでなく、カラム内での pH が異なるため、有機酸の分離パターンにも違いが生じます。

分析条件	
分離カラム	: Shim-pack IC-A3 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
移動相	: 8.0 mmol/L p-hydroxybenzoic acid 3.2 mmol/L Bis-Tris, 50 mmol/L Boric acid
流量	: 1.2 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 50 μL
検出	: 電気伝導度検出器 (ノンサプレッサ方式)

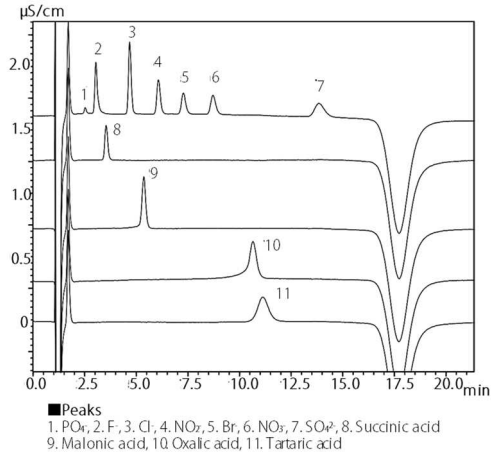


図 16 ジカルボン酸の分離例 (ノンサプレッサ方式)

イオンクロマトグラフ
HIC-ESP のサイトはこちら



陰イオン分析用サプレッサイオンクロマトグラフ HIC-ESP

3. LC-MS による有機酸の検出

LC-MS を用いた有機酸の検出には、酸性移動相での分離と組み合わせたネガティブモードでの直接検出法や、ニトロフェニルヒドラジン（NPH）試薬を用いたプレラベル誘導体化法が用いられます。LC-MS では、有機酸だけでなくアミノ酸と併せて一次代謝物一斉分析し、メタボロミクス解析に用いられることもあります。

3-1. 直接検出法

スルホン化ポリスチレン樹脂を固定相とした Shim-pack SPR-H を用い、LC-MS/MS で有機酸を直接検出した例を図 17 に記します。Shim-pack SPR-H は、先に紹介した Shim-pack SCR-102H と同様の分離モードですが、過塩素酸水溶液や *p*-トルエンスルホン酸水溶液は LC-MS の移動相としては適さないため、ギ酸水溶液を用いて分離しています。ギ酸や酢酸は LC-MS の移動相に添加されることが多いため、本検出法では高感度での定量を必要とする分析には適しません。

分析条件 (LC)	
分離カラム	: Shim-pack SPR-H (250 mm × 4.6 mm I.D., 8 μm)
移動相	: 0.2 % ギ酸水溶液
移動相流量	: 0.2 mL/min
ポストカラム溶媒	: アセトニトリル
ポストカラム溶媒流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 45 °C
注入量	: 10 μL

分析条件 (MS)	
イオン化法	: ESI (Negative)
ネブライズガス流量	: 1.5 L/min
ドライイングガス流量	: 10 L/min
DL 温度	: 250 °C
ヒートブロック温度	: 400 °C

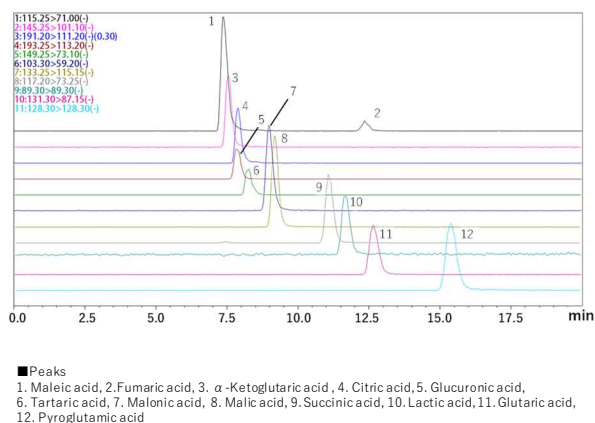


図 17 Shim-pack SPR-H を用いた有機酸の LC-MS/MS 分析

3-2. 誘導体化法

LC-MS を用いることにより有機酸を直接検出することは可能ですが、揮発性の高い有機酸を高感度に検出することは困難です。試薬と対象成分を予め反応させておくことにより、揮発性の高い有機酸を検出することが可能になります。図 18 に、3-NPH（ニトロフェニルヒドラジン）を用いて誘導体化した C2～C5 の短鎖脂肪酸とピルビン酸などの有機酸を一斉分析した例を示します。この分析に関する詳細な内容は Application News No.C168 「SPF および抗生剤投与マウス糞便試料中の短鎖脂肪酸・有機酸（3-NPH 誘導体）分析」をご覧ください。

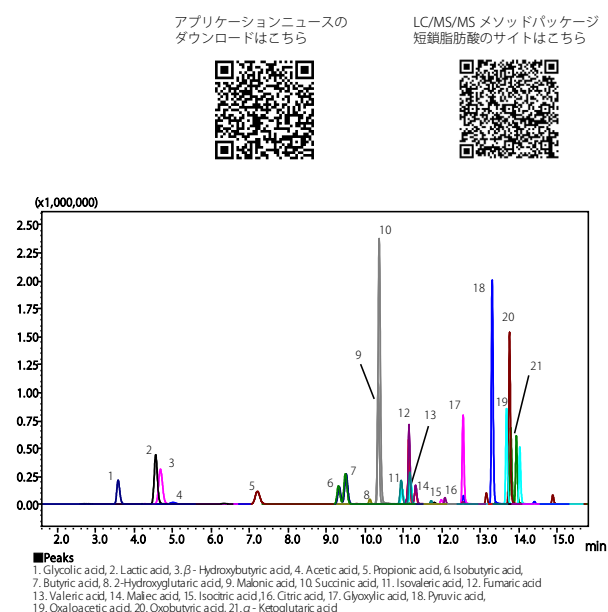


図 18 3-NPH 誘導体化による有機酸・短鎖脂肪酸の一斉分析

トリプル四重極高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8060 のサイトはこちら



超高速トリプル四重極型質量分析計
LCMS™-8060

4. GC および GC/MS による有機酸の分析

GC および GC/MS による有機酸の分析には、主にトリメチルシリル (TMS) 化といった誘導体化処理後の試料を分析に供します。図 19 に TMS 化処理した有機酸の分析時における MRM クロマトグラムを示します。この分析に関する詳しい内容は Application Data Sheet No.59 「GC-MS/MS を用いたラット尿中の代謝物分析」をご覧ください。

アプリケーションデータシートのダウンロードはこちら

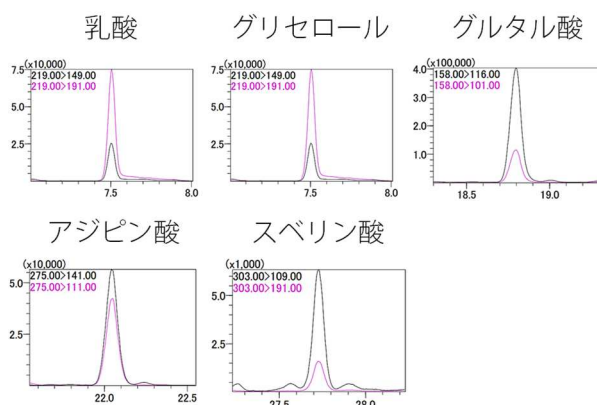


図 19 GC/MS/MS による尿中の代謝物 (TMS 化) MRM クロマトグラム

トリプル四重極ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040 NX のサイトはこちら



トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計
GCMS-TQ™8040 NX

なお、酢酸やプロピオン酸など、C6 以下の炭素鎖をもつ短鎖脂肪酸は揮発性が高く、TMS 誘導体化における乾固の工程で、これらの酸の多くは揮発します。そのため、これらの化合物を誘導体化するには TMS 試薬は適していません。DMT-MM(4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride) 試薬のように、水やメタノールの中でカルボン酸とアミンの縮合反応を起こす試薬を用いた方法は、C6 以下の炭素鎖をもつ短鎖脂肪酸をターゲットとした分析への誘導体化法として適用されていると知られています。図 20 に DMT-MM 試薬存在下、n-オクチルアミンと短鎖脂肪酸の反応機構、図 21 に DMT-MM 試薬による誘導体化後の短鎖脂肪酸の分析例を示します。この分析に関する詳しい内容は Application News No.M273 「GC/MS による生体試料中の短鎖脂肪酸の分析の分析」をご覧ください。

アプリケーションニュースのダウンロードはこちら

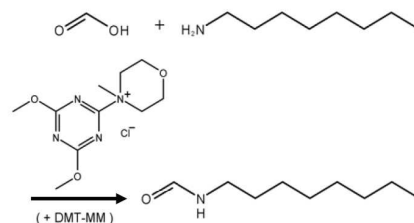


図 20 n-オクチルアミンと短鎖脂肪酸との反応

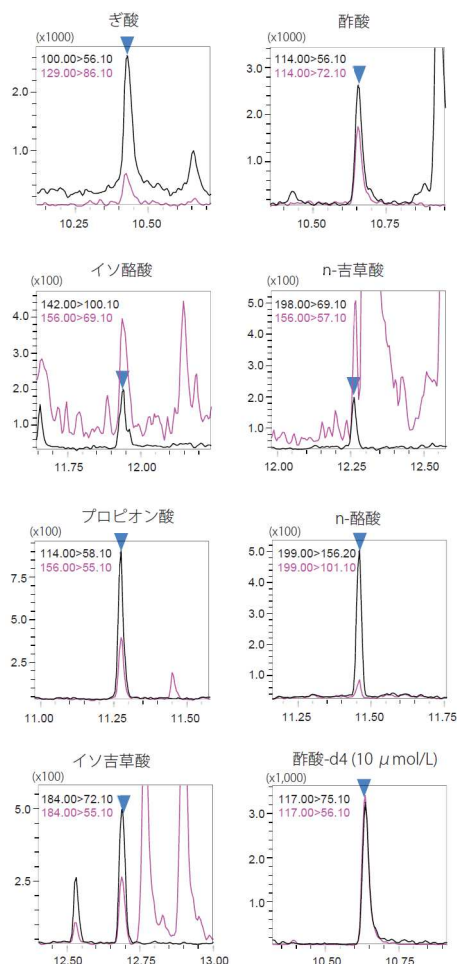


図 21 GC/MS/MS による短鎖脂肪酸の MRM クロマトグラム

5. 実試料の分析例

5-1. 医薬品の有機酸分析例

医薬品開発において、薬剤化合物の対となるイオン（カウンターイオン）が選択されます。医薬品有効成分（Active Pharmaceutical Ingredients）の性質は医薬品の塩の形成によって変わるので、最適なカウンターイオンの選択は医薬品開発においては重要です。また、合成段階で使用する触媒やイオンなどの無機不純物の残留物が製品の溶解性や安定性に影響を及ぼすこともあるため、不純物としてのイオンの分析が必要になることもあります。合成された API から不純物を取り除くために、HPLC による分取・精製が用いられることが一般的で、移動相には酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸 (TFA) が用いられています。またペプチドの固相合成では、合成したペプチドの固相からの切り離しに TFA が用いられています。図 22 にヒドロキシコバラミン酢酸塩の、図 23 にアンジオテンシン I TFA 塩の分析例を示します。この分析の詳細内容は Application News No.L457A「医薬品中のイオン分析（その4）イオンクロマトグラフィーによるカウンター陰イオンの分析」をご覧ください。

アプリケーションニュースの
ダウンロードはこちら

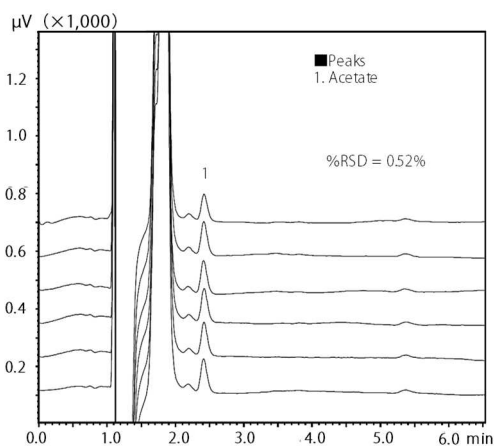


図 22 ヒドロキシコバラミン酢酸塩の分析

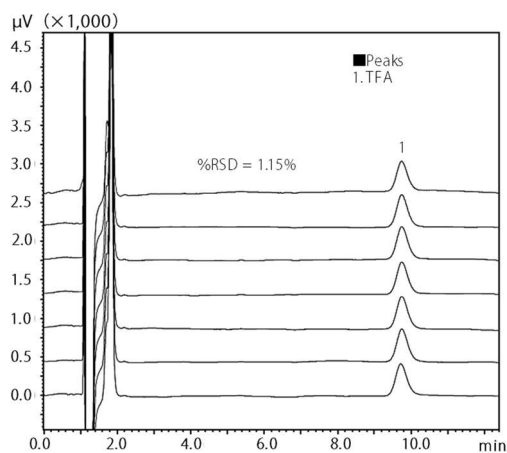


図 23 アンジオテンシン I TFA 塩の分析

5-2. ライフサイエンス関係の有機酸分析例

再生医療の産業化や発酵による抗体医薬品・有用物質の製造の場において、さまざまな培地が用いられており、培養プロセスの最適化および工程管理のモニターが実施されています。培養中の培地成分は代謝に必要な有機酸・糖・アミノ酸などの様々な化合物で構成されており、バイオプロセスを確認・考察する上では化合物の代謝状態をモニターすることが必要です。また、夾雑成分が多い培地中の有機酸を定量するには、選択性が高い検出方法を適用する必要があります。図 24 に培地の有機酸を分析した例を示します。この分析の詳細内容は Application News No.L490「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」をご覧ください。

アプリケーションニュースの
ダウンロードはこちら

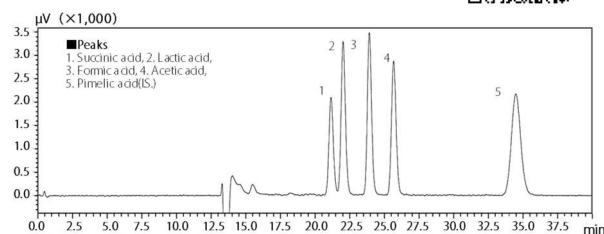


図 24 培地中の有機酸の分析

近年、腸内細菌が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつあります。腸内細菌は食物繊維や難消化性糖類をエネルギー源として、短鎖脂肪酸を産生しており、これらの成分が体内に吸収されることによって自己免疫疾患や生活習慣病に関連している可能性があるといわれており、疾患の関連の研究において、短鎖脂肪酸の定量分析が必要になります。多くの場合は代謝物を網羅的に測定するため LC-MS や GC/MS が用いられますが、微生物代謝により生成された短鎖脂肪酸の定量といったように、ターゲットが明確である場合には、HPLC によって分析されます。図 25 に HPLC によるマウス糞便抽出液中の有機酸を分析した例を示します。この分析の詳細内容は Application News No.L516「有機酸分析システムの腸内細菌叢研究への応用」をご覧ください。

アプリケーションニュースの
ダウンロードはこちら

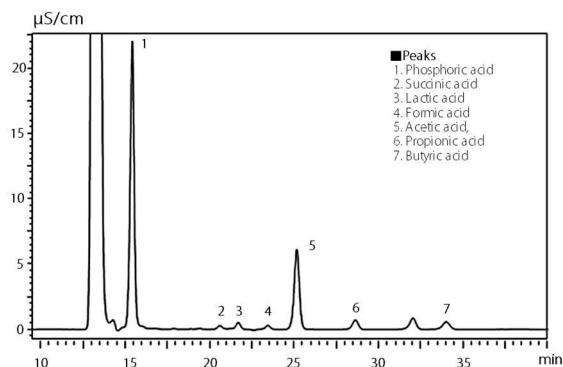


図 25 HPLC によるマウス糞便抽出液の分析

また、糞便試料の微生物により短鎖脂肪酸が代謝されることを考慮すると、揮発や代謝を防いだ条件により保管し、測定までの時間を短くすることが重要であると考えられます。糞便中に含まれる短鎖脂肪酸には、炭素鎖が長い酪酸や吉草酸が含まれることがあり、Shim-pack SCR-102H による分離条件では分析時間が長くなる傾向にあります。そこで、有機酸高速分析カラム Shim-pack Fast-OA を用いて、短時間にサル糞便中の短鎖脂肪酸を測定した例を図 26 に示します。この分析の詳細な内容は Application News No.L555「有機酸高速分析 Shim-pack Fast-OA による腸内細菌叢研究の生産性向上」をご覧ください。

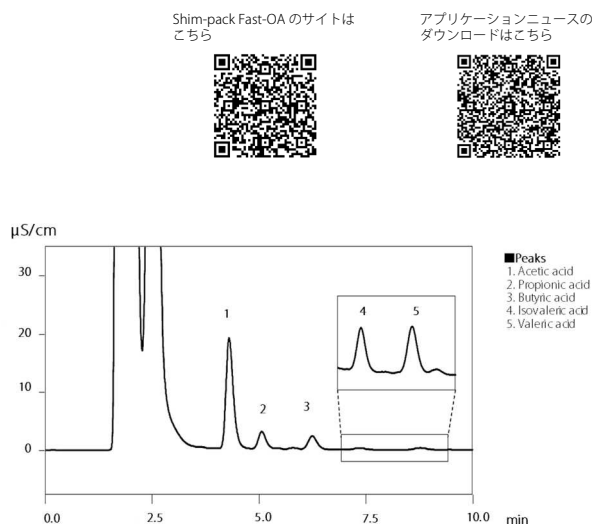


図 26 Shim-pack Fast-OA によるサル糞便抽出液の分析例

腸内細菌が産生した短鎖脂肪酸を短時間かつ多成分を測定する場合には LC-MS や GC/MS を用います。LC-MS で短鎖脂肪酸を幅広く測定するには、ニトロフェニルヒドラジン試薬により誘導体化処理した試料を LC-MS により分析します。この方法を用い、生理的な腸内細菌が存在するマウスの糞便を試料として、短鎖脂肪酸および有機酸分析を行いました。その例を図 27 に示します。この分析の詳細な内容は Application News No.C168「SPF および抗生剤投与マウス糞便試料中の短鎖脂肪酸・有機酸 (3-NPH 誘導体) 分析」をご覧ください。

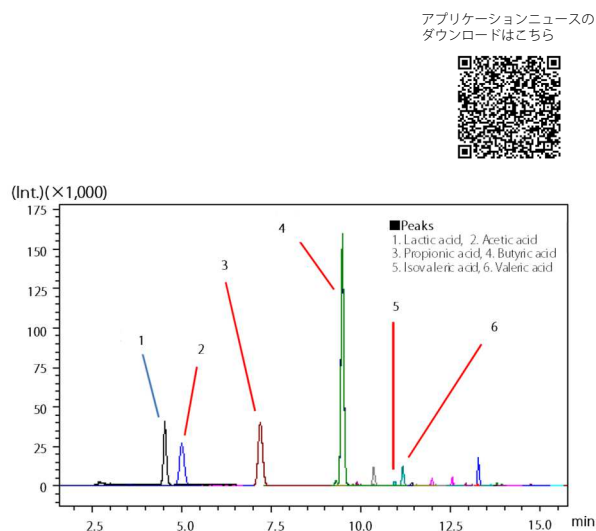


図 27 マウス糞便試料の分析例

有機酸、糖やアミノ酸などの一次代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析もまた腸内細菌叢の影響を解明する方法の一つとして注目されています。前述のとおり、LC-MS/MS による一次代謝物の一斉分析法は、イオンペア試薬非添加移動相とイオンペア試薬添加移動相の 2 つの分析条件があります。これらの 2 条件を用いて、LC-MS/MS でマウス糞便抽出液を測定した例を図 28 に示します。また、同じマウス糞便抽出液を誘導体化し、GC/MS で測定した例を図 29 に示します。また、試料の誘導体化手順は、「メタボロミクス前処理ハンドブック (C146-2181)」をご参照ください。同一試料を LC-MS および GC/MS で測定した結果、イオンペア試薬添加条件による LC-MS での測定ではアミノ酸を中心に 17 成分が、イオンペア試薬非添加条件による LC-MS での測定では、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、有機酸等が 75 成分検出されました。また、GC/MS での測定では、短鎖脂肪酸および有機酸、糖などを中心に 100 成分検出されました。糞便中の代謝物を網羅的に測定するには、目的に応じて分析手法を使い分けることが有効です。腸内細菌叢が産生する代謝物分析に関する詳しい内容は Application Note No.48「GC-MS/MS、LC-MS/MS による代謝物の網羅的分析 — 腸内環境研究への応用 —」をご覧ください。

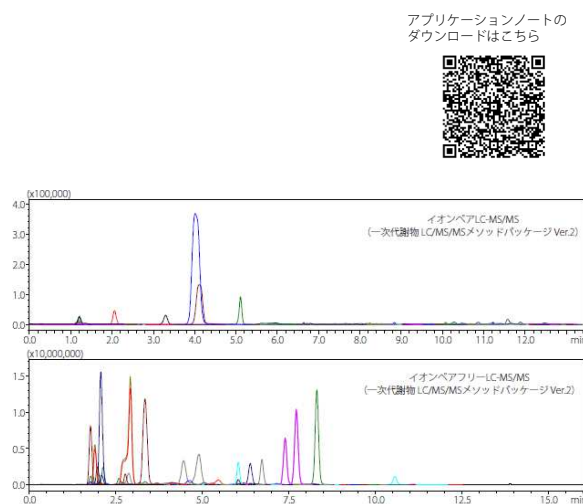


図 28 LC-MS/MS によるマウス糞便抽出液の分析例

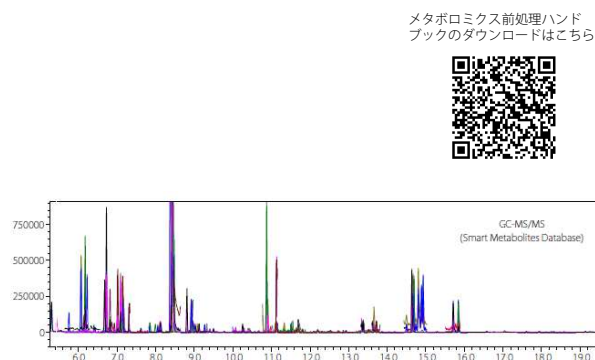


図 29 GC/MS/MS によるマウス糞便抽出液の分析例

5-3. エネルギー関係の有機酸分析例

持続可能な社会を実現するため、次世代の再生可能エネルギーの研究は近年活発化しています。再生可能エネルギーの研究のひとつに、人工光合成があげられます。人工光合成の研究には、酸化チタンなどの光触媒による光化学的二氧化碳還元反応があります。二氧化碳炭素の還元反応では、反応生成物として一酸化炭素や低級炭化水素の他に、有機酸などの有機酸が生成されることがあります。有機溶媒試料の場合、HPLC で分析するには水や移動相で希釈する必要があります。GC や GC/MS による分析が適している場合があります。ここではバリア放電イオン化検出器 (BID) を搭載した GC により、ppm オーダーの有機酸を誘導体化せず直接分析した例を図 30 に示します。この分析の詳細内容は Application News No.G280C「GC-BID による有機酸の高感度分析—人工光合成の研究における有機酸の高感度分析—」をご覧ください。※GC を用いた有機酸分析には誘導体化を用いる方法が一般的ですが、カルボキシル基が一つの化合物であれば直接検出も可能です。

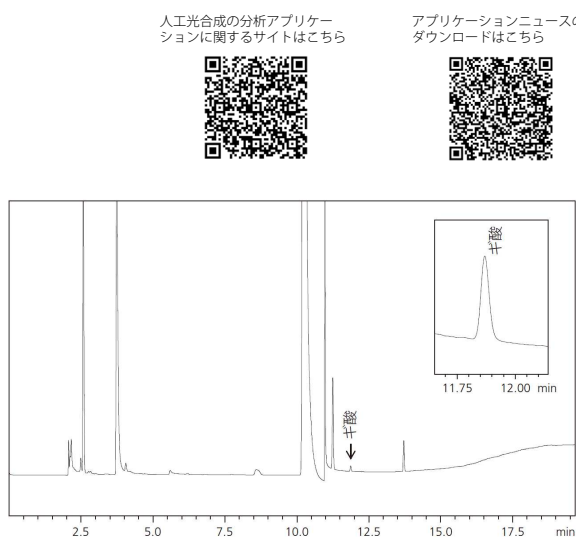


図 30 二酸化炭素還元反応液中 有機酸の分析

ガスクロマトグラフ Nexis GC-2030 のサイトはこちら



ガスクロマトグラフ
Nexis™ GC-2030

化石燃料の代替燃料としてバイオマス資源からバイオエタノールなどのバイオ燃料の製造についても注目されています。バイオマスは地球上に広く存在し、カーボンニュートラルな資源で、間伐材や廃棄物などの有効利用は経済・環境観点ともに利点があります。バイオマス資源を発酵させてバイオ燃料を製造するプロセスにおいて、有機酸やフルフラール、ヒドロキシメチルフルフラールなどのフラン化合物が副次的に生成し、これらが発酵を阻害する成分になるため、これらの成分をモニターすることは必要です。図 31 にバイオマス中の有機酸およびフラン類の分析例を示します。この分析の詳細内容は Application News No.L485「有機酸分析システムによるバイオマスの分析」をご覧ください。

バイオマスエネルギーの分析
アプリケーションに関する
サイトはこちら



アプリケーションニュースの
ダウンロードはこちら

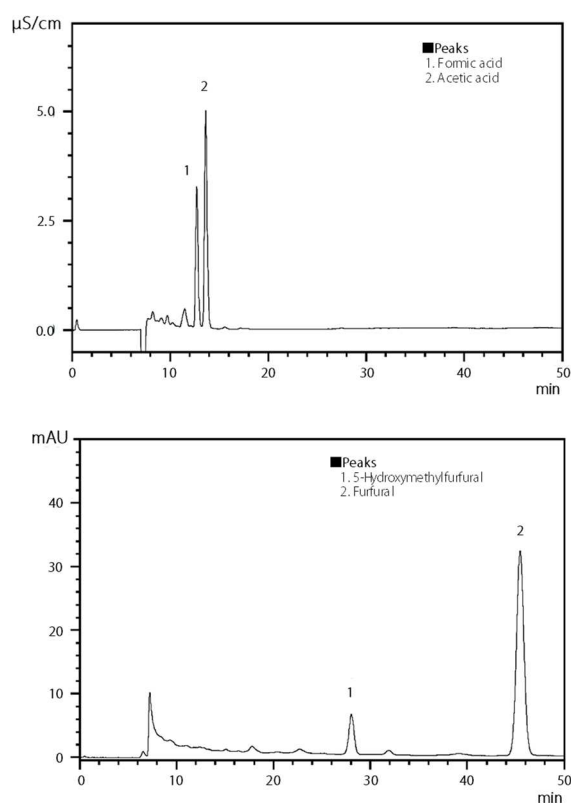


図 31 バイオマス中の有機酸 (上) およびフラン類 (下) の分析

また、バイオ燃料中に含まれる成分のうち、ギ酸、酢酸、プロピオン酸は金属腐食に影響する成分ともいわれており、一般の車両に使用される際はその濃度を管理する必要があります。図 32 にバイオディーゼルと軽油の混合燃料を測定した例を示します。この分析の詳細内容は Application News No.L352「バイオ燃料の分析（その 2）バイオディーゼル燃料混合軽油中 ギ酸、酢酸、プロピオン酸の分析」をご覧ください。

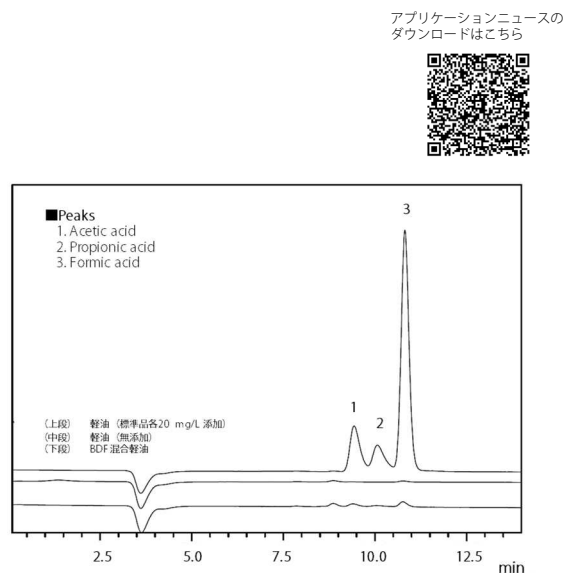


図 32 軽油、バイオディーゼル混合軽油の分析

バイオマス資源のエネルギーや化学品原料への変換技術の研究する場では、変換収率や反応プロセスに着目する必要があります。木質系バイオマスのうち、60~70 %を占めるセルロースからグルコースに変換し、さらに触媒反応させることでグルコースから、付加価値の高いヒドロキシメチルフルフラールや乳酸などの有機酸を生成することが確認されています。このプロセスの解析において、揮発性成分の同定が必要になります。図 33 に触媒反応後のグルコース水溶液を測定した例を示します。この分析に関する詳しい内容は Application Data Sheet No.94「バイオマス研究における固体酸触媒反応によるグルコース分解生成物の GC/MS 分析」をご覧ください。

アプリケーションデータシートの
ダウンロードはこちら

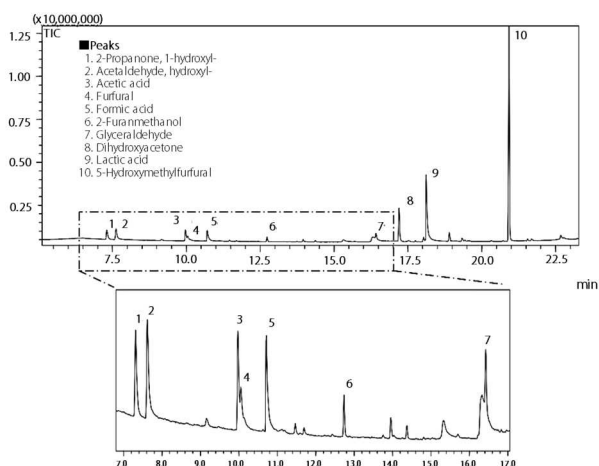


図 33 触媒反応後グルコース水溶液の分析

5-4. 環境関係の有機酸分析例

多くの工場では、生産の際に使用された水は環境中へ排出される前に適切な水処理がされています。排水中に含まれる成分は生産されているものによって異なりますが、悪臭の原因である酪酸や吉草酸などの有機酸が含まれていることがあります。図 34 に排水中の有機酸を測定した例を示します

分析条件	
分離カラム	: Shim-pack SCR-102H (300 mm × 8.0 mm I.D., 7 μm)
ガードカラム	: Guard Column SCR-102H (50 mm × 6.0 mm I.D.)
移動相	: 5 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸水溶液
移動相流量	: 0.8 mL/min
pH 緩衝液	: 0.1 mmol/L EDTA および 20 mmol/L Bis-Tris を含む 5 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸水溶液
pH 緩衝液流量	: 0.8 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 10 μL
検出	: 電気伝導度検出器

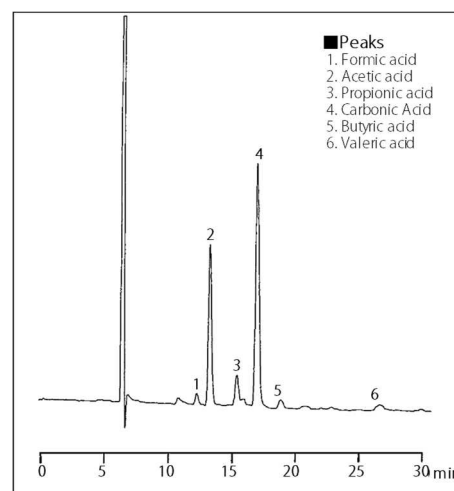


図 34 排水中の有機酸の分析

5-5. 食品中の有機酸分析例

食品や飲料には発酵プロセスを経て製造されるものが多様にあります。それらの製品には有機酸だけでなく糖やアミノ酸などの一次代謝物が複雑に関与し、製品を特徴づける要素となっています。ワインには醸造過程で産生された有機酸とブドウ由来の有機酸が含まれており、特にワインの味に影響を与えていると考えられています。図 35 に HPLC を用いたワイン中の有機酸の分析例を示します。一般的に紫外吸光度検出器による検出が多いですが、電気伝導度検出では、夾雑の影響を受けずに選択性の高い分析が可能です。

分析条件	
分離カラム	: Shim-pack SCR-102H (300 mm × 8.0 mm I.D., 7 μm) × 2 本
ガードカラム	: Guard Column SCR-102H (50 mm × 6.0 mm I.D.)
移動相	: 5.0 mmol/L 過塩素酸水溶液
移動相流量	: 0.8 mL/min
pH 緩衝液	: 0.1 mmol/L EDTA および 20 mmol/L Bis-Tris を含む 5 mmol/L 過塩素酸水溶液
pH 緩衝液流量	: 0.8 mL/min
カラム温度	: 35 °C
注入量	: 10 μL
検出 1	: 電気伝導度検出
検出 2	: 紫外吸光度検出器 : 210 nm

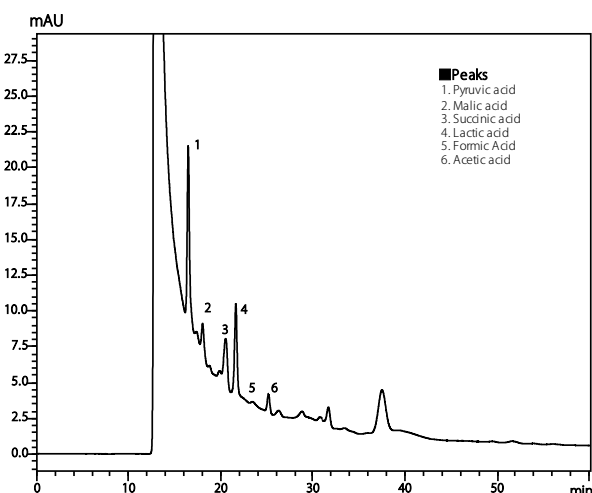
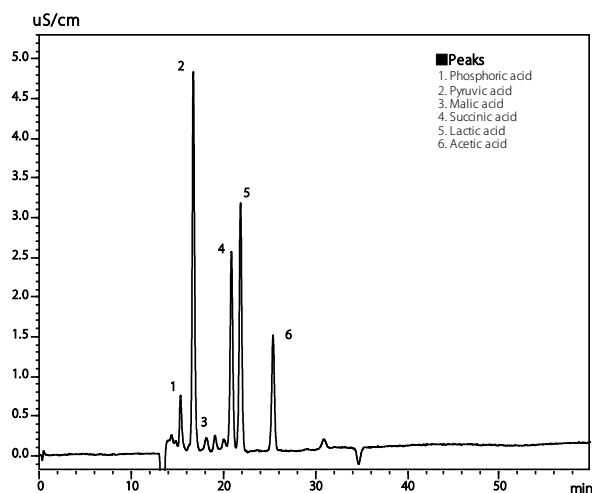


図 35 HPLC によるワイン中の有機酸の分析
(上：電気伝導度検出、下：紫外吸光度検出器)

また、図 36 にイオンクロマトグラフによりワインを分析した例を示します。ワイン中の有機酸の他、酸化防止剤である亜硫酸塩由来の硫酸イオンの他、無機イオンの分析が可能です。

分析条件	
分離カラム	: Shim-pack IC-A3 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
移動相	: 8.0 mmol/L <i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸 3.2 mmol/L Bis-Tris, 50 mmol/L ほう酸水溶液
流量	: 1.2 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 50 μL
検出	: 電気伝導度検出器 (ノンサプレッサ方式)

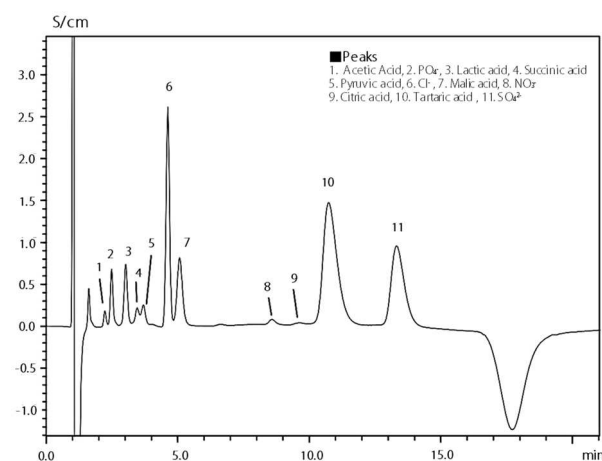


図 36 イオンクロマトグラフによるワインの分析

食品や飲料には、さまざまな有機酸が含まれており、それら成分は風味・香気に寄与していると言われています。コーヒーには多くの有機酸成分が含まれています。コーヒーの生豆の状態から含まれているものにりんご酸、くえん酸などがあります。ぎ酸や酢酸は、コーヒー豆を焙煎する際に生成します。これらの有機酸成分はコーヒーの酸味に大きな影響を与えます。図 37 にコーヒー中の有機酸の分析例を示します。

分析条件	
分離カラム	: Shim-pack SCR-102H (300 mm × 8.0 mm I.D., 7 μm) × 2 本
ガードカラム	: Guard Column SCR-102H (50 mm × 6.0 mm I.D.)
移動相	: 5 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸水溶液
移動相流量	: 0.8 mL/min
pH 緩衝液	: 0.1 mmol/L EDTA および 20 mmol/L Bis-Tris を含む 5 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸水溶液
pH 緩衝液流量	: 0.8 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 10 μL
検出	: 電気伝導度検出器

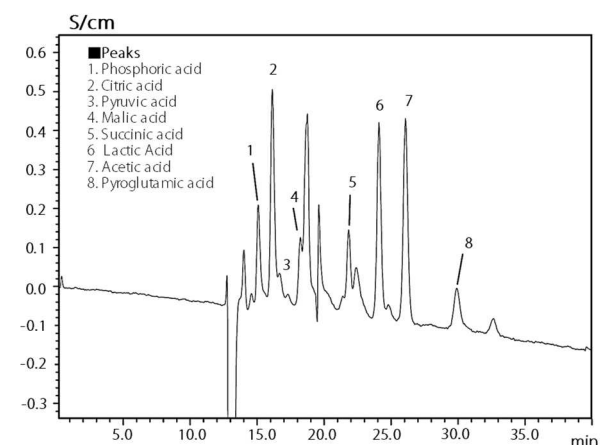
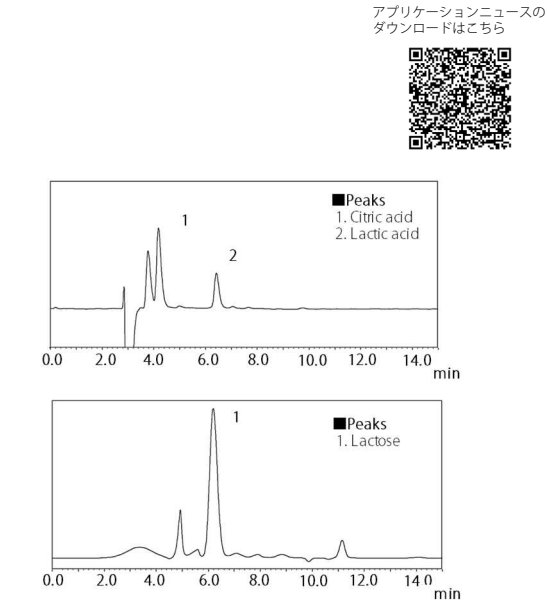
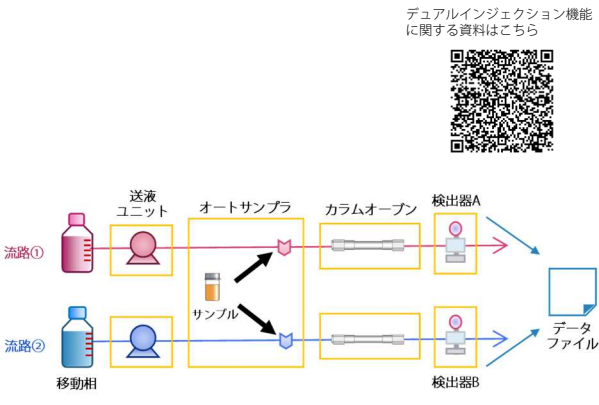


図 37 コーヒー中の有機酸の分析

発酵製品の開発においては、発酵条件最適化のため、有機酸、糖、アミノ酸など複数の化合物をモニタリングします。HPLCでのこれらの分析には、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、別々の装置システムが必要です。Nexeraシリーズのオートサンプラの新たな機能：デュアルインジェクション機能は独立した2つの流路それぞれに試料を注入し、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。有機酸の高速分析と糖種の分析を1システムで同時に行った際の流路図を図38に、分析例を図39に示します。この分析の詳しい内容はApplication News No.L548「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」をご覧ください。



食品に含有される成分にはある程度関連があり、呈味に与えています。食品業界でも有機酸をはじめとした一次代謝物を解析し、官能評価試験との結果を関連付けする例もあります。ここではコーヒーの例を紹介します。

同一条件で準備した8種類のコーヒーを官能試験しました(表2)。8種類のコーヒーをGC/MSを用いて分析した結果、192成分の一次代謝物が検出されました。官能試験の結果とGC/MS分析によって検出された代謝物の結果を統計解析し、表3に示す関連性が高かった成分群の一つである4-ヒドロキシ安息香酸と官能試験の結果を比較した結果を図40に示します。この結果から官能試験の結果と代謝物分析の結果を関連付けられることが示唆されました。この分析の詳しい内容はApplication News No.M274「代謝物の網羅分析によるコーヒー官能試験評価の回帰モデル作成」をご覧ください。

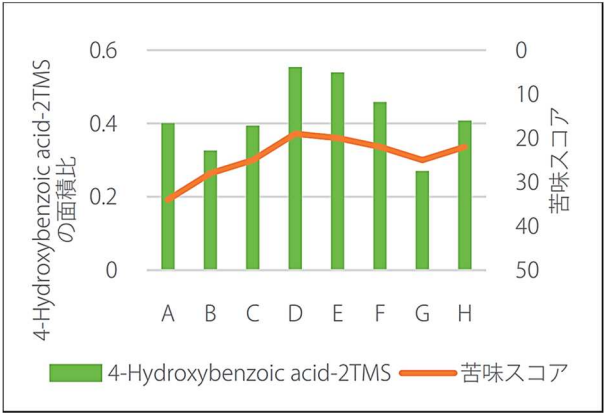


表2 官能試験の結果

	A	B	C	D	E	F	G	H
苦味スコア	34	28	25	19	20	22	25	22

表3 官能試験との関連性が高い成分グループ

正方向に寄与する成分	負方向に寄与する成分
Glycine-3TMS	4-Hydroxybenzoic acid-2TMS
Arabitol-5TMS	Glyceraldehyde-meto-2TMS
Mannitol-6TMS	Erythrulose-meto-3TMS
Glucose-meto-5TMS	Glucuronic acid-6TMS
3-Phenyllactic acid-2TMS	Coniferyl aldehyde-meto-TMS
Glucuronic acid-meto-5TMS	5-Oxoproline-2TMS
Octanoic acid-TMS	Niacinamide-TMS
2-Aminoethanol-3TMS	Dihydroxyacetone-meto-2TMS
	Tryptamine-2TMS



食品をはじめとする製品に対する異臭クレームの件数は近年増加傾向にあり、異臭の原因となる物質の特定にはGC/MSでの測定が適用されています。異臭は、カビ臭・消毒臭・腐敗臭に区別されますが、腐敗臭の原因物質は主に有機酸や低級脂肪酸であると言われています。異臭のクレームは早急に対応することが求められるため、迅速に前処理し分析する必要があります。異臭クレームがあった製品（異常品）と正常な製品を細断し、この試料を高温で加熱し（加熱脱離法）、発生した成分をGC/MSで測定した例を図41に示します。この分析の詳細な内容はApplication Data sheet No.136「加熱脱離（TD）法による化学製品中の異臭分析」をご覧ください。

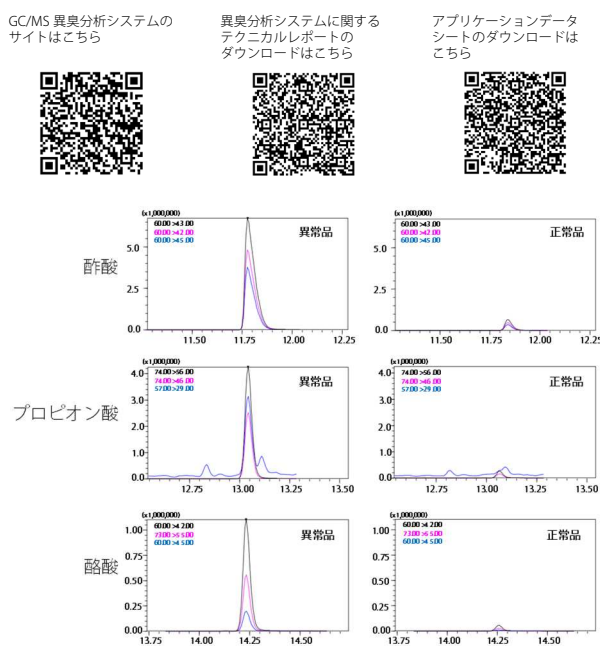


図41 異臭クレーム品と正常品の分析例

加熱脱離 GCMS のサイトはこちら



加熱脱離 GCMS™ システム

5-6. メタボロミクスの網羅的な分析例

メタボロミクスは、生命活動により生じる様々な代謝物を網羅的に検出・解析し、生体内の生命現象を包括的に調べる手法です。サンプル全体に含まれる代謝物の変動や推移といった“代謝物の総量”を測定する「定量メタボロミクス」と“代謝物の分布”を測定する「イメージングメタボロミクス」では用いる装置が異なります。ここでは、主に「定量メタボロミクス」について説明します。

定量メタボロミクスでは、サンプル中の代謝物の総量の測定において、GC/MS や LC-MS が使われます。図42に各手法の測定対象成分、表4に各手法の特徴を示します。測定対象成分や目的に応じて装置を使い分ける必要があります。

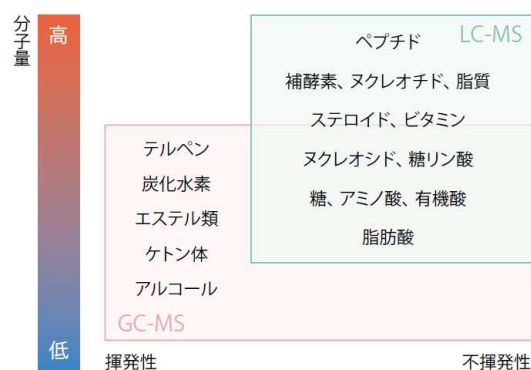


図42 GC/MS および LC-MS によるメタボロミクスの対象成分

表4 GC/MS および LC-MS の測定の特徴

GC/MS	LC-MS
1回の測定で数百成分を網羅的に測定可能	特定の代謝物（～100成分）を簡便に測定可能
堅牢性に優れたスタンダードな測定法	前処理を含め、短時間で測定可能
導入コストが低い	分子量が高く、不揮発性の代謝物も測定可能
網羅的測定のファーストチョイス	特定成分を効率的にルーティン測定するのに最適

メタボロミクスでは一次代謝物として主に糖、アミノ酸と併せて有機酸を対象にします。LC-MS ではイオンペア試薬添加した移動相と ODS カラムの組み合わせの分離条件やイオンペア試薬なしの移動相と PFPP カラムを用いた分離条件により一次代謝物を一斉に分析することが可能です。とくにイオンペア添加なしの移動相による一斉分析は、TCA 回路で産生されるくえん酸やフマル酸をはじめとした成分を含め、多くの有機酸を分析することが可能です。図 43 に LC-MS/MS による一次代謝物の一斉分析例を記します。詳細は「LC/MS/MS メソッドパッケージ一次代謝物 Ver.2」の製品サイトをご覧ください。

LC/MS/MS メソッドパッケージ
一次代謝物 Ver.2 のサイトは
こちら

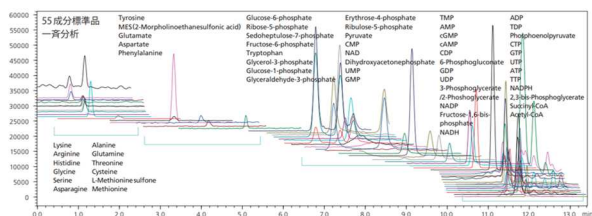


図 43 LC-MS/MS による一次代謝物の一斉分析例

前述の通り、GC/MS を用いて有機酸を測定するには誘導体化が必要になりますが、1 度の分析で 475 成分の代謝物を一斉に分析することが可能です。図 44 に Smart Metabolites Database™に含まれている分析条件を用い、トマトの成熟葉中の代謝物を一斉分析した例を、図 45 に検出された糖、有機酸、アミノ酸、核酸のマスキロマトグラムの例を示します。試料中から 170 種の代謝物を検出することができました。この分析に関する詳細な内容は Technical Report C146-0356 「GC/MS/MS を用いた植物試料中の代謝物一斉分析」をご覧ください。

Smart Metabolites Database の
サイトはこちら



テクニカルレポートの
ダウンロードはこちら

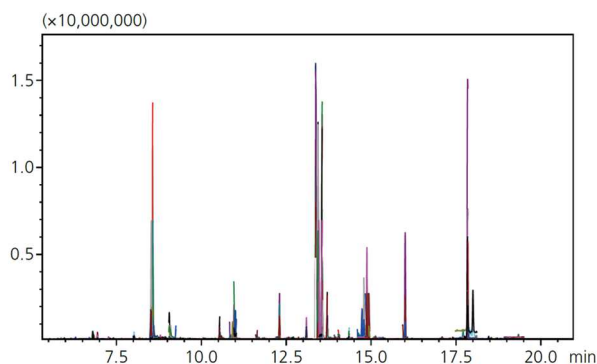


図 44 トマト成熟葉に含まれる代謝物成分の TIC

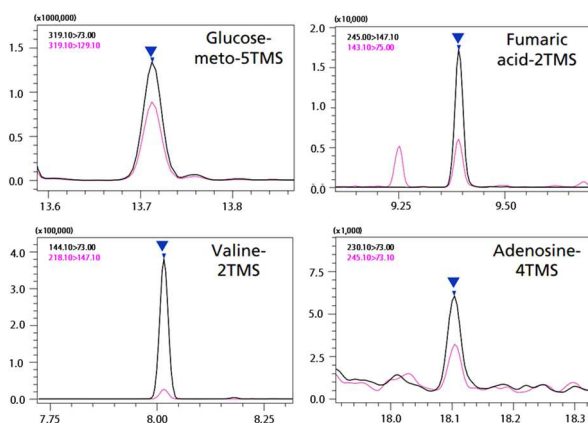


図 45 糖、有機酸、アミノ酸、核酸のマスキロマトグラム

6. まとめ

有機酸の分析には様々な分野で、様々な分析手法が用いられています。ご覧いただいたように、試料や化合物、目的によって使用する最適な分析装置が異なることがわかりました。試料溶媒によっては、脱水や抽出などの前処理が必要になることもあり、一方で誘導体化によって検出の高感度化や選択性を高めるといった方法があります。メタボロミクス解析のように有機酸以外の成分を網羅的に分析する方法のなかでも、ルーチンとして分析をするのであれば LC-MS、数百成分を一斉分析するのであれば、GC/MS を、といったように目的に応じて、最適な分析手法を選択することが必要です。

Shim-pack, Nexera, ICDS, LCMS, GCMS-TQ, Nexis, GCMS、および Smart Metabolites Database 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 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。

初版発行：2020 年 5 月
© Shimadzu Corporation, 2020

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ Nexera™シリーズ
超高速液体クロマトグラフ

関連分野

＞ 食品・飲料

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ