

# LC TALK

Vol. 115  
April 2021



Talk *In silico* chromatography …… P. 2

TEC 安定同位体標識試薬を用いた定量分析 …… P. 4

Products 超高速液体クロマトグラフ  
Nexera 応用システム …… P. 7

Applications バイオマス発酵工程および酵母菌培養工程  
における有機酸モニタリング …… P. 10

## Talk

*In silico* chromatography公益財団法人 体質研究会  
花井 俊彦

*In silico* chromatographyとは計算機を使ってコントロールするクロマトグラフィーでもクロマトグラフィーの結果を処理する意味でもない。過去に記録計からインテグレーターに変えた時に、保持時間だけでなくピークの高さや面積も打ち出してくれた時の喜びとは異なり、実験者が計算機と対話しながら化学を考えるクロマトグラフィーと捉えることができる。つまり、単に統計処理をするのではなく、データ集の中から読みだしてくれるシステムでもなく、化合物の特性を計算して教えてくれるシステムである。化学を考える(計算する)計算化学は有機化学の授業では早くから取り入れられ、2分子が近づくと電子の移動が起こり、2つの異なる分子として離れる動画も作られている。つまり、化学実験の可視化に使われるのが計算化学であり、定性的に想像していた化学現象を可視化して理解し易くするだけでなく、結果を数値の違いとして打ち出してくれるので、現象面を定量的に理解することを助けてくれる。分析化学において指示薬の色の変化を指示薬の構造変化とpHを変えて測定したスペクトルを比較して教えることが、化学現象を可視化した説明の最初と考えられるが、液体クロマトグラフィーの初期には植物からの抽出物が充填ガラスカラムを通すと分離した異なる色の層として観察されたことから色グラフと称した。但し、色の化学構造との対比はされていない。

クロマトグラフィーのカラム内における相互作用を化学構造から可能性で定性的に説明してきたが、説明に使われている相互作用の寄与程度を説明していない。近年、話題となった親水性相互作用によるクロマトグラフィーの説明がすっきりしないのも基本的な現象を定量的にとらえていないので、それぞれの寄与の程度が解らないことによる。親水性相互作用液体クロマトグラフィーの現象は高速液体クロマトグラフィーの初期から報告されていて、逆相分配液体クロマトグラフィーと称されていた実験で、有機溶媒濃度を濃くしていくと、短くなってきた保持時間が長くなりだす現象

を、<多分、水素結合によるのではないかと推論しても、溶離液に水を含むので、<あり得ないのでは?>と話題にしていた。この現象の明確な説明は、計算化学を使って、モデル分子間の相互作用を調べると定量的にできる

次に、水溶液中ではカルボン酸は解離定数からpHが3.5以下で分子型、pH 5.0以上ではイオン型、アミンはpHが9.5以下ではイオン型で存在することを踏まえて、これら分子間の水溶液中での挙動を2分子の一方は充填剤の保持基、もう一方を溶質分子と見なして考える。例えば、図1において、構造A(赤:酸素、青:窒素、黄色:炭素、白色:水素)に示すように、イオン化したカルボン酸とアミンのイオン同士を7Åの距離で向かい合わせて構造最適化すると構造Bのようにイオン同士が接する。表1のA→Bの分子間相互作用エネルギー値から、構造Aの2分子が独立した状態から接した構造Bになると、静電気(ES)相互作用エネルギー値7.149 kcal·mol<sup>-1</sup>が生じ、水素結合(HB)及び疎水性相互作用の指標であるファンデルワールス(VW)エネルギー値はそれぞれ0.000と0.260 kcal·mol<sup>-1</sup>であることから、これら2分子はES相互作用、つまり、イオン-イオン相互作用で接していることが解る。イオン化したカルボン酸とアルコールを6Åの距離に近づけて(構造C)、構造最適化(構造D)するとC→Dの分子間相互作用エネルギー値からES相互作用(2.849 kcal·mol<sup>-1</sup>)で接することが解る。分子型のカルボン酸とイオン化したアミン(構造E)は構造FのようにES相互作用(2.411 kcal·mol<sup>-1</sup>)で接するが、分子型アミンとイオン化したカルボン酸のアルキル基同士を3Åの距離に近づけて構造最適化すると、弱いVWで接することが解る(0.635 kcal·mol<sup>-1</sup>)。強いイオン-イオン相互作用の場合と違って、VWのように相互作用が弱い場合には2分子を近づける必要がある。

ヘキシニル基を基準にして、イオン化したアミンと3 Åで向かい合せて（構造I）構造最適化すると2分子間の距離が縮まり、VW値0.560 kcal·mol<sup>-1</sup>で接する。アルコールと3.5 Åの距離で向かい合せて構造最適化すると（構造K）、HBおよびVW値が2.570及び1.435 kcal·mol<sup>-1</sup>であることから、主たる相互作用はHBであることが解る。カルボン酸と3.5 Åの距離で向かい合せて構造最適化すると、HB及びES値が9.147及び13.479 kcal·mol<sup>-1</sup>であることからカルボン酸はHB及びES相互作用で接することが解る。更に、イオン化したカルボン酸と2.5 Åの距離に近づけて向かい合せて、構造最適化すると、これら分子は反発し合って距離が2.9 Åと広がるだけでなく、ES値はマイナスになる。これらの計算で用いた2分子間の初期距離は2分子が接して構造変化をきたした距離で、2分子間の距離が長いと、これら2分子は近づく（相互作用する）ことなく、初期状態を保つ。

相互作用エネルギー値で説明できる利点は、今まで相互作用の説明に使ってきた用語をファンデルワールス力、水素結合、静電気相互作用の3つのエネルギー値として説明できることで、静電気相互作用にはパイパイ、ダイポール-ダイポール、電荷移動型錯体形成とルイス酸塩基にイオン-イオン相互作用が含まれ、イオン-イオン相互作用の場合には静電気相互作用エネルギー値が大きい。実際にクロマトグラフィーの結果を定量的に論じるにはモデル相を構築する必要があり、充填剤の表面構造が解かっていな

いので、予想モデル相を構築せざるを得ない。この為に実験値の保持比log k値と計算で得られる相互作用エネルギー値との相関が理想とするほど高値を得られない場合があるが、全体としてどのようなことが起こっているかを把握するには問題がない。誤差は生化学実験と違って、クロマトグラフィーは物理化学実験であり、保持時間の再現性が良い反面、計算に用いるモデル相が完全からほど遠いことに起因する。更に、脱離の主役である溶媒との相互作用（溶解度）も理解する必要がある。完全解を得るコンピュータプログラムの完成を待っていたのでは進歩がないので、どこまでできるのかを挑戦するのが化学者の意思である。

解り易い低分子間の挙動を理解することになれば、複雑な光学異性体認識基を構築して、光学異性体の認識、更に蛋白質の基質認識の違いを定量的に解析できるようになる。計算化学の利用は分離分析条件を検討するだけでなく、酵素反応の定量解析もできる自己学習である。幅広い化学現象を取り入れている分析化学に、有機化学で使われている学習法を取り入れ、慣れれば生物化学の学習もする。今後は無機化学の学習にも使われるであろう。

#### 参考文献

- 1) <http://www.hanai-toshihiko.net>
- 2) T.Hanai, Quantitative *In Silico* Chromatography: Computational Modelling of Molecular Interactions, Royal Society of Chemistry (2014)

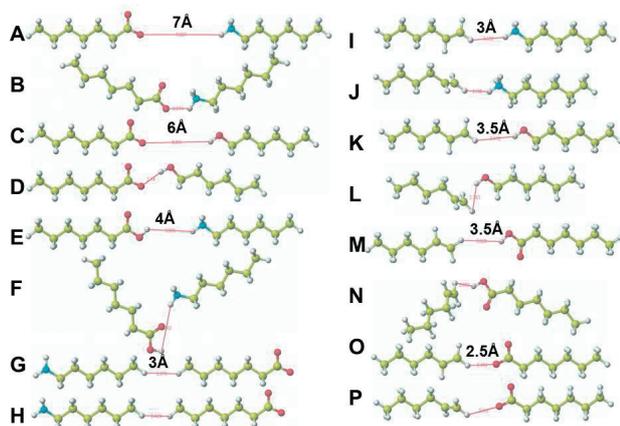


図1 簡便な分子間相互作用モデル

表1 分子固有相互作用によるエネルギー値の変化

	HB	ES	VW
C <sub>6</sub> COOH	-3.412	-6.661	3.007
C <sub>6</sub> COO-	0.000	0.000	2.951
C <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>	0.000	0.000	2.400
C <sub>6</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0.000	0.000	2.694
Hexenyl	0.000	0.000	2.108
相互作用	ΔHB	ΔES	ΔVW
A→B	0.000	7.149	0.260
C→D	0.000	2.849	0.356
E→F	-0.018	2.411	0.839
G→H	0.000	0.007	0.635
I→J	0.000	0.102	0.560
K→L	2.570	0.106	1.435
M→N	9.147	13.479	1.471
O→P	0.000	-0.135	0.356

#### 執筆者紹介

1974年京都大学工学部助手として「非水溶媒クロマトグラフィーに関する若干の研究」で博士号を取得以来、ノースイースタン大学（ボストン）、コロラド大学（ボルダー、コロラド）、モントリオール大学（モントリオール、ケベック、カナダ）でポスドク、研究助手として10年過ごした後帰国。体質研究会研究員として、北里大薬では学生の研究を助けながら、真の博士号として、「分子間相互作用の定量分析」として、クロマトグラフィーの保持機構の定量解析及び生体機能解析への応用研究を継続。計算化学を用いる分析化学を配信。

専門分野 分析化学

将来の夢 地球が死ぬまで好きなアメリカ、カナダと日本の旅を続けられたら

趣味 季節の訪れに合った美味しいものを料理して食する

# TEC

## 安定同位体標識試薬を用いた定量分析

消耗品ビジネスユニット  
箕畑 俊和

質量分析計を用いた微量分析において、信頼性の高い定量を行うために内標準物質として安定同位体標識された化合物を用いる手法が普及しています。標識に用いる安定同位体には炭素 ( $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ )、水素 ( $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ もしくはD)、窒素 ( $^{14}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}$ )、酸素 ( $^{16}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ ) などが存在します。これら安定同位体は

化学的、物理化学的性質がほぼ同等ですが、質量数が異なります。この特性を活用して、質量分析と組み合わせた多くの分析アプリケーションが開発されています。

本稿では、定量分析法における安定同位体標識試薬の必要性について解説します。

### 1. 絶対検量線法と内標準法

定量計算は試料を構成している各成分が、どの程度の量または割合（濃度）で含まれているのかを知るために行います。液体クロマトグラフィー（LC）では、カラムによって分離溶出された成分は検出器を通過することにより電気信号に変換され、ピークとなって表れます。一般的には、このクロマトグラムの各ピーク面積の大小は、物質量の多少に比例します。

#### ① 絶対検量線法

絶対検量線法とは、既知濃度の標準試料を使ってあらかじめ検量線を作成し、未知試料中の成分を定量する方法です。目的成分のみ検出できていれば定量計算を行えるので、比較的簡単に分析することができます。目的成分が分離検出できていれば定量が可能ですが、注入量の誤差がそのまま定量値の誤差になるため、注意が必要です。

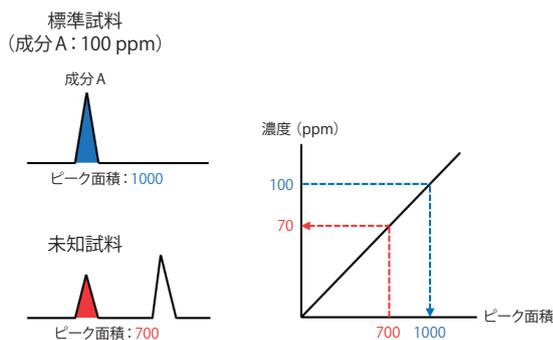


図1 絶対検量線法

#### ② 内標準法

内標準法とは、目的成分と内標準物質のピーク面積比と濃度比の関係を元に目的成分の濃度を求める定量方法で、目的成分と内標準物質が検出できれば定量計算できます。濃度比は注入量に依存しませんので、注入量の誤差を補正することが可能であり、また組成の違いによる試料密度の違いの影響を受けにくいというメリットもあります。しかし、目的成分と内標準物質の濃度が分かっている標準試料が必要である点、すべての未知試料に正確な濃度となるように内標準物質を添加する必要があります。加えて、LCで内標準法を用いる場合では、試料中のすべての成分とほぼ完全に分離され、かつ分析目的成分の近くに溶出する化合物を選定する必要があります。

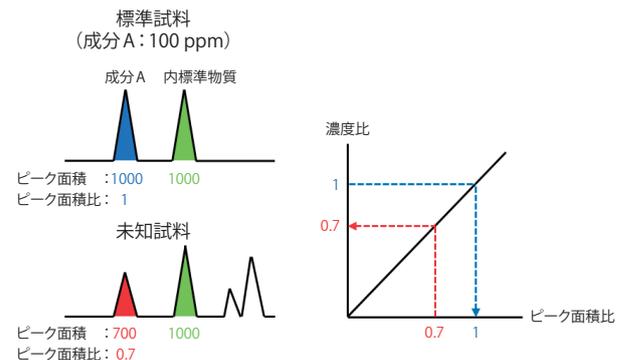
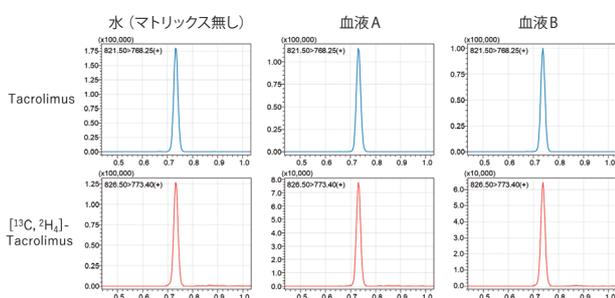


図2 内標準法

## 2. 質量分析における安定同位体標識試薬を用いた内標準法の必要性

一般的にLCでは、試料中の各成分の固定相と移動相に対する親和性（保持力）の差によって成分を分離し、成分の性質によってUV吸収、蛍光強度、電気伝導度などで検出します。これら検出法では、物質の定性は主に保持時間で、定量はピーク強度・面積で行います。一方、質量分析法（MS）は試料成分を様々な方法でイオン化させ、 $m/z$ によって分離し、各イオンの強度を測定する高感度な検出法です。得られるマススペクトルは、ある質量のイオンがどの程度存在するかを示すことができますので、定性分析の大きな助けになります。質量は分子に特有の情報であり、MSによりこれらの情報をダイレクトに得ることができるからです。LC-MSは分離能力に優れたLCと定性能力に優れたMSを結合した装置で、スキャン測定より得られるマススペクトルでは溶出成分に分子量と構造情報を与え、他のLC検出器より得られる保持時間による定性を補完します。また、ごく微量な物質の選択的な分析法として、三連四重極質量分析計（MS/MS）を用い、物質特有の $m/z$ から選択的に目的化合物を測定するためにMultiple Reaction Monitoring（MRM）が用いられます。

LC-MS（/MS）を用いた定量分析を行う場合、共存するマトリクス成分により目的物質のイオン化効率が影響を受ける懸念があります。物質の性質や種類、マトリクス、さらにLCで使用する移動相の条件により、イオンエンハンスメントもしくはイオンサプレッションが起こります（マトリクス効果）<sup>1)</sup>。図3に、マトリクスを含まない水と2つの異なる全血中のTacrolimusと安定同位体標識されたTacrolimusのMRMクロマトグラムおよびその面積値を示します。マトリクスの有無、さらに全血の種類が異なることで面積値が変動することが確認できます。試料前処理によりマトリクス除去を試みることもできますが、目的物質とマトリクスに適した前処理法の検討が必要です。



	水 (マトリクス無し)	血液 A	血液 B
(A) Tacrolimus 面積値	224314	145197	120599
(B) [ <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-Tacrolimus 面積値	149358	95256	80061
面積比 (A) / (B)	1.50	1.52	1.51

図3 TacrolimusのMRMクロマトグラムおよびその面積値

マトリクス効果による精度の低下を克服するための方法として、安定同位体標識された物質を用いた内標準法があります。同じ分離条件では、目的物質と安定同位体標識された内標準物質は保持時間がほぼ同じとなります。よって、マトリクス効果もほぼ同じとなり、ピーク強度への影響もほぼ同じとなります。また、試料前処理においてもほぼ同じ回収率を示します。図3において、異なるマトリクス存在下でTacrolimusと安定同位体標識されたTacrolimusの面積比を確認したところ、ほぼ同一でした。このように、優れた補正効果により良好な定量結果を得ることができます。

内標準物質として目的物質と構造が類似した物質を用いる方法もありますが、前処理法での回収率が異なる、マトリクスによるイオン化効率の違いにより、定量精度に影響を及ぼす可能性があります。同位体標識された内標準は高価なものもあり、目的の物質全てについて市販品があるわけではありません。そこで、1つの安定同位体標識された内標準を複数の物質の定量に用いるという方法がありますが、リスクが存在します。

表1に、内標準物質の違いによる6種類の薬物の定量結果を示します。正イオンで検出される3つの薬物に対応する内標準として、正イオンで検出される[<sup>3</sup>H]-Diazepamを用いた場合、理論値と実測値は近い値を示しました。しかし、負イオンで検出される3つの薬物について[<sup>3</sup>H]-Diazepamを内標準として用いた場合、理論値から大きくずれることを確認しました。一方、負イオンで検出される[<sup>3</sup>H]-Phenobarbitalを内標準として用いた場合、定量結果は大きく改善されました。この結果から、LC-MS（/MS）では試料前処理の影響やマトリクス効果、イオン化モードを鑑みて、定量する物質に適した内標準を選択する必要があります。

表1 上段：同一の内標準物質を用いた定量結果  
下段：対応する内標準物質を用いた定量結果

化合物名	イオン化	内標準物質	イオン化	添加濃度 (理論値、ng/mL)	測定濃度 (実測値、ng/mL)	誤差 (%)
Diazepam	+	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	1	0.98	98%
Flunitrazepam	+	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	1	0.96	96%
Triazolam	+	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	0.1	0.09	90%
Amobarbital	-	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	10	106.2	1062%
Barbital	-	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	10	221.1	2211%
Phenobarbital	-	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	10	81.1	811%

化合物名	イオン化	内標準物質	イオン化	添加濃度 (理論値、ng/mL)	測定濃度 (実測値、ng/mL)	誤差 (%)
Diazepam	+	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	1	1.01	101%
Flunitrazepam	+	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	1	0.98	98%
Triazolam	+	[ <sup>3</sup> H]-Diazepam	+	0.1	0.11	110%
Amobarbital	-	[ <sup>3</sup> H]-Phenobarbital	-	10	9.2	92%
Barbital	-	[ <sup>3</sup> H]-Phenobarbital	-	10	8.51	85%
Phenobarbital	-	[ <sup>3</sup> H]-Phenobarbital	-	10	10.3	103%

### 3. 重水素標識体に対する<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O標識体のメリット

臨床や環境など様々な分野でLC-MS (MS) の使用は着実に増加しています。目的成分を定量するために、LC-MS (MS) の感度、特異性、スループットが求められています。安定同位体標識された内標準物質はこれらのアッセイに重要な役割をもち、分析メソッドの精度を向上し、正確な結果を提供するのに役立ちます。

#### ① 重水素 (<sup>2</sup>H or D) 標識

安定同位体で最も頻繁に用いられる重水素 (<sup>2</sup>H or D) による標識は、第1世代の安定同位体標識と言われており、合成が比較的容易で安価なことから、現在も様々な分野で幅広く使用されています。しかし、置換された重水素原子はpH変化や酸塩基反応などの外的影響により分子から脱離しやすく、さらに溶媒等に存在する水素原子と容易に入れ替わり、内標準物質から重水素が失われる可能性があります。試料中にある一部の安定同位体標識物質の重水素が脱離し、水素に置換された物質が生じた場合、これは「偽陽性」となり、誤って高い濃度として報告される可能性が生じます。重水素の脱離・置換は、定量結果の精度を損なう危険性があります。

また、重水素は標識の位置や数により、非標識物質とは僅かながら挙動が異なる場合があります。この同位体効果により、重水素化標識物質と非標識物質で保持時間が大きく異なる可能性があります。図4に、Progesteroneとその重水素体のMRMクロマトグラムを示します。非標識物質と重水素標識物質で約6秒の相違が見られました。逆相クロマトグラフィーにおいては、他の物質の場合も僅かですが重水素標識物質の溶出が非標識物質より早いことを経験しています<sup>2)</sup>。

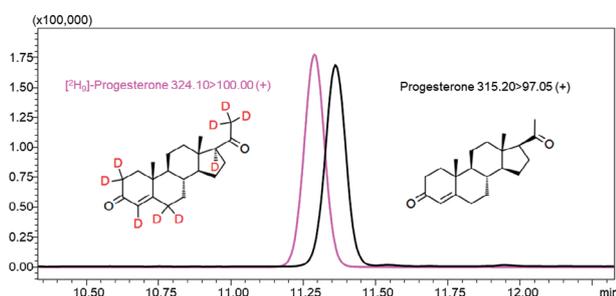


図4 Progesteroneと[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-ProgesteroneのMRMクロマトグラム

#### ② <sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O標識

<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>Oの安定同位体による標識は第2世代と言われており、重水素と比較して安定性に優れる、重水素を用いることができない部位への標識が可能、などの特長があります。<sup>13</sup>CはpH変化や酸塩基反応などの外的影響を受けにくい

炭素骨格に導入できるため、化学的に安定であり、酸処理やpH変化を含む多段階の前処理過程において影響を受けにくく、前処理が必要となる極微量定量分析の内標準物質として活用されています。重水素標識で生じる脱離も<sup>13</sup>Cでは起こらず、<sup>13</sup>Cは重水素と比較して同位体純度が高いことから、高純度で標識することができます。また、<sup>13</sup>C標識された物質と非標識物質は、ほぼ同じ保持時間を示します。唯一の欠点として、<sup>13</sup>Cを導入するためにより複雑な合成が必要であり、結果として高価になる可能性があります。

<sup>15</sup>Nは窒素を導入する位置の選択肢が少ないため、その使用はより制限されますが、<sup>13</sup>Cと同じ利点があります。<sup>18</sup>Oは<sup>15</sup>Nと同じく導入する位置が限られますが、1原子あたり+2 amuが増加される利点があります。安定同位体を複数導入する必要がある場合、重水素や<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>Oの標識は併用が可能です。

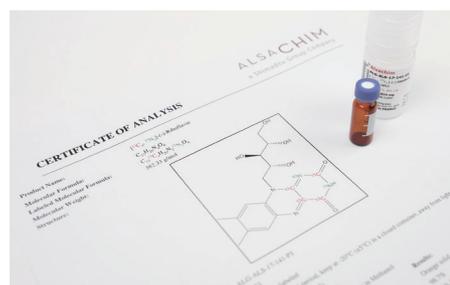
以上のことから、LC-MS (MS) で高精度な定量分析を行うためには安定同位体標識試薬を用いた内標準法が有効です。さらに、<sup>13</sup>Cを用いた内標準物質を用いることで安定した微量分析が可能となります。

#### 参考文献

- 1) Y. Sano, *J. Mass Spectrom Soc. Jpn.* 64(3), 81-85(2016)
- 2) T. Berg et al., *J. Chromatogr. A*, 1218, 9366– 9374(2011)

#### Alsachim について

Alsachim (アルザシム) は、世界でも限られた企業しか製造できない安定同位体標識物質を合成・製造する高度な技術を有している試薬メーカーで、2017年に島津製作所と経営統合しました。主に、<sup>13</sup>Cの安定同位体の標識を得意としており、医薬品やその代謝物、生理活性物質、規制薬物など約6000以上の安定同位体標識された物質が製造可能です。すべての化合物には、分光分析、保存条件、有効期限・再分析日、さらにNMRおよびLC/MSによる化学的純度や質量同位体純度を記載した分析検査証 (Certificate of Analysis; CoA) が付属されます。



## Products

# 超高速液体クロマトグラフ Nexera™ 応用システム

LCビジネスユニット  
細井 千尋

超高速液体クロマトグラフ Nexera シリーズは、40年以上にわたる島津LCの歴史の中で培った技術を継承、さらに進化させた次世代のLCシステムです。昨今、分析の現場では熟練のLCユーザーが減少しつつあり、経験の浅いユーザーに分析ノウハウが継承されないケースが増えてきています。Nexera シリーズは、Analytical intelligence に基づく各種分析支援機能、さらなる分析効率および装置性能の向上を実現するハードウェアの新技术を開発、搭載しました。Nexera 応用システムは、この Nexera シリーズをベースに分析条件と装置構成をパッケージ化したシステム製品です。Nexera 応用システムでは、移動相や反応試薬などを専用の調製済みキットで準備していますので、試薬調製の負担を軽減し、調製ミスをなくした確実なデータ採取が可能となります。



Nexera ポストカラム  
アミノ酸分析システム

### 1. Nexera ポストカラムアミノ酸分析システム

Nexera ポストカラムアミノ酸分析システムは、ポストカラム蛍光誘導体化検出により、夾雑成分が多い試料中のアミノ酸を選択的かつ高感度に定量できます。食品分野をはじめ天然物や医薬品といった幅広い分野で活用されています。

#### ● 検出原理

アミノ酸の紫外吸収波長は、一部の芳香族アミノ酸を除き短波長域 (200 ~ 210 nm) であり、吸光光度検出では感度や選択性が不十分となります。本システムでは、陽イオン交換カラムでアミノ酸を分離後、第一反応液の次亜塩素酸ナトリウムによりプロリンなどの二級アミンを一級アミンに変換し、第二反応液のOPA (オルトフタルアルデヒド) /N-アセチルシス테인試薬によりアミノ酸を蛍光物質へと誘導体化後、蛍光検出します。アミノ酸分析には、タンパク質を構成する約20成分のアミノ酸をターゲットとしたNa型条件、遊離アミノ酸を含む約40成分をターゲットとしたLi型条件があります。

#### ● 高い選択性と高感度を実現

島津独自のOPA/N-アセチルシス테인試薬により、夾雑成分を多く含む試料のアミノ酸も高感度に選択性良く検出できます (図2)。

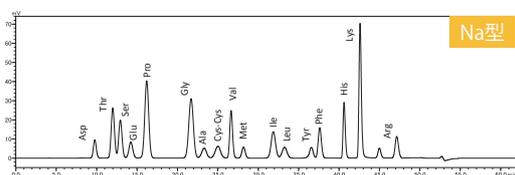


図2 アミノ酸標準品のクロマトグラム (Na型条件)

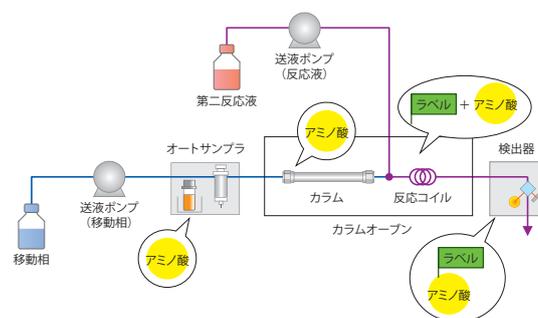


図1 Nexera ポストカラムアミノ酸分析システム

#### ● 専用移動相・試薬キット

アミノ酸の分析において分離の再現性を高めるために、移動相、反応試薬を厳密に調製することが重要です。特に、移動相に関しては厳密な pH 調整が必要です。アミノ酸分析移動相・試薬キット (図3) は、開封後すぐに使用いただけるように調製された溶液状態で梱包されています。



移動相 OPA 試薬

図3 アミノ酸分析キット

## 2. Nexera 臭素酸分析システム

Nexera 臭素酸分析システムは、水質検査方法に基づくイオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光度検出法（告示法）により臭素酸を選択的に高感度検出するシステムで、水道水質分析などに活用されています。

### ● 検出原理

専用カラムにより臭素酸イオン ( $\text{BrO}_3^-$ ) を分離後、三臭素イオン法によるポストカラム誘導体化を用います。ポストカラム反応では、 $\text{BrO}_3^-$  を臭化カリウム-硫酸溶液と反応させ、生成する三臭素イオン ( $\text{Br}_3^-$ ) を紫外吸光度検出します（図4）。

### ● 水質基準の 1/10 濃度を優れた精度で定量

水道水の分析では、基準値の 1/10 濃度である 0.001 mg/L (1  $\mu\text{g/L}$ ) の面積繰り返し再現性 (RSD) が 10% 以内となる定量精度が求められます。本システムでは、基準値の 1/10 濃度まで、十分な S/N と良好な面積再現性で定量が可能です（図5）。

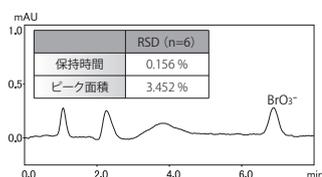


図5 臭素酸イオン標準液 (0.001 mg/L) のクロマトグラムと再現性

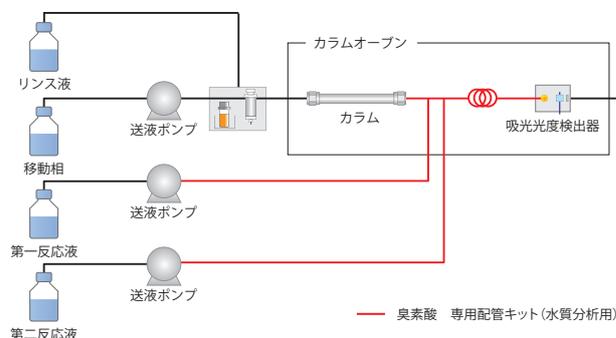


図4 Nexera 臭素酸分析システム

### ● 分析用試薬セット

移動相、反応液を最小限の手順で簡単に調製するセットです。移動相\*と反応液①\* (亜硝酸カリウム溶液)、反応液② (臭化カリウム溶液) がセットされています。本試薬セットでは、水道水質分析に求められる定量精度を合格することを確認した性能報告書を同梱の上、出荷しています。

\*移動相、反応液①は希釈して使用

## 3. Nexera シアン分析システム

Nexera シアン分析システムは、水質検査方法に基づくイオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光度検出法（告示法）によりシアン化物イオンおよび塩化シアンを選択的に高感度検出するシステムで、水道水質検査などに活用されています。

### ● 検出原理

専用カラムによりシアン化物イオン ( $\text{CN}^-$ ) と塩化シアン ( $\text{CNCl}$ ) を分離後、塩素化液 (クロラミンT) により  $\text{CN}^-$  を  $\text{CNCl}$  にします。これら  $\text{CNCl}$  に 4-ピリジカルボン酸ピラゾロン溶液を反応させ、青色生成物を可視吸光度検出します（図6）。

### ● 水質基準の 1/10 濃度を優れた精度で定量

水道水の分析では、臭素酸と同一のピーク面積繰り返し再現性が求められます。本システムでは、基準値の 1/10 濃度まで、十分な S/N と良好な面積再現性で定量が可能です（図7）。

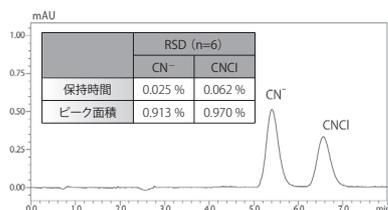


図7 シアン化物イオン、塩化シアン標準液 (各 0.001 mg/L) のクロマトグラムと再現性

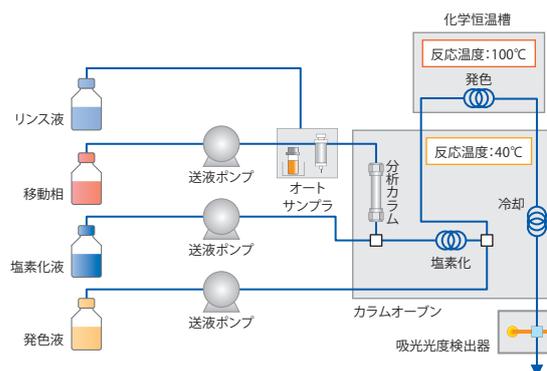


図6 Nexera シアン分析システム

### ● 分析用試薬セット

移動相、反応液を最小限の手順で簡単に調製できるセットです。移動相\*、塩素化液\*および発色液\*、標準液調製用希釈液がセットされています。本試薬セットでは、水道水の分析に求められる定量精度を合格することを確認した性能報告書を同梱の上、出荷しています。

\*移動相は希釈、塩素化液および発色液は粉末試薬を溶解して使用

## 4. Nexera 有機酸分析システム

Nexera 有機酸分析システムは、イオン排除クロマトグラフィーによる分離と島津独自の pH 緩衝化—電気伝導度検出法により、有機酸を高選択性かつ高感度に定量するシステムです。食品分野や環境分野を中心に、医薬品分野やライフサイエンス分野においても活用されています。

### ● 検出原理

有機酸はカルボキシ基を有するため、短波長に吸収をもちますが、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。本システムでは、イオン排除カラムにより有機酸を分離後、pH 緩衝化試薬を連続的に加えて pH を中性付近にして電気伝導度検出します (図8)。pH を中性付近に保つことにより、バックグラウンドノイズを低減させて有機酸を解離状態にし、高感度に電気伝導度検出できます。

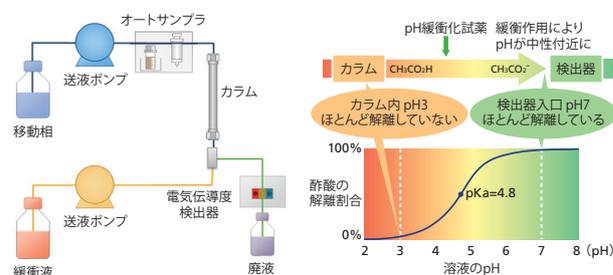


図8 Nexera 有機酸分析システム

### ● 高い選択性と高感度を実現

夾雑成分を多く含む試料の有機酸定量も島津独自の検出法により、夾雑成分の影響を抑え選択性良く高感度検出できます (図9)。

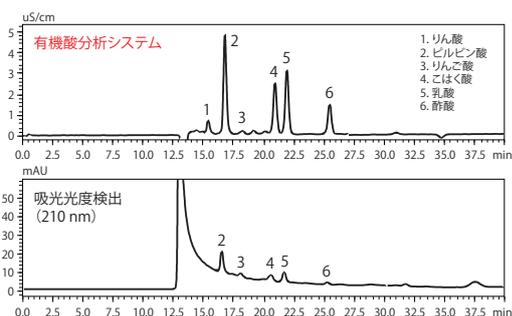


図9 ワインの分析

### ● 専用移動相試薬セット

有機酸分析移動相試薬セット (図10) は、開封後すぐに使用いただけるように調製された溶液の状態に梱包されているため、溶液調製にかかる時間やコストを削減するだけでなく、調製ミスを心配することなく安定してデータ採取できます。



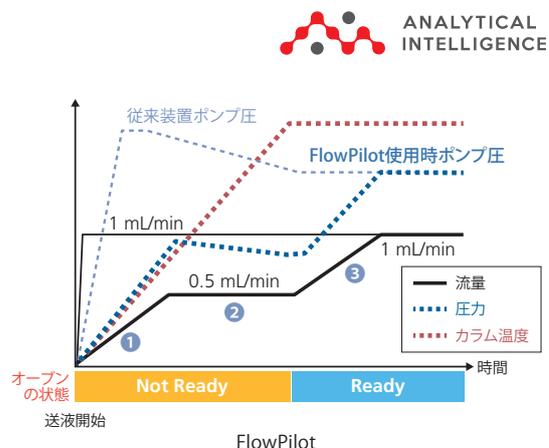
図10 有機酸分析移動相試薬セット

## 応用システムでの分析を支援する Analytical intelligence 機能

Analytical intelligence 機能が、熟練度によらず同じ結果を得られるように分析業務を支援します。移動相流量制御機能 FlowPilot は、カラムオープン温度に合わせて流量を制御します。急激な圧力負荷によるカラム劣化を避け、各応用システムの高価な分析カラムを保護。手間をかけず自動でシステムを Ready 状態までコントロールします。

また、移動相モニターを使用すれば重量センサーにより、移動相や反応液、オートサンプラのリンス液の残量をリアルタイムですべてモニタリング可能です。枯渇の可能性が生じれば PC やスマートデバイスに通知し、補充のタイミングを事前に判断しやすくなります。

※ 詳細につきましては、LCtalk Vol.108 をご参照ください。



Analytical Intelligence は、島津製作所が提案する分析機器の新しい概念です。システムやソフトウェアが、熟練技術者と同じように操作を行い、状態・結果の良し悪しを自動で判断し、ユーザーへのフィードバックやトラブルの解決を行います。また、分析機器に対する知識や経験の差を補完し、データの信頼性を確保します。

## Applications

# バイオマス発酵工程および酵母菌培養工程における有機酸モニタリング

グローバルアプリケーション開発センター  
田邊 彩乃

バイオエタノールはカーボンニュートラルな再生可能エネルギーであり、地球温暖化防止対策や石油代替燃料として世界中で研究が進められています。さらに、食料不足や価格高騰の懸念から、第二世代としての開発が、稲わらや木材など非食用植物のセルロースやヘミセルロースを原料として行われています。しかし、第二世代は繊維部分の分解・発酵に多くの工程を必要とします。その過程で発生する酢酸、ギ酸、乳酸などの有機酸が発酵を阻害し、生成するエタノールの収率に大きな影響を与えます。そのため、発酵途中における有機酸の挙動を把握することが、エタノール収率管理において非常に重要なポイントになります。

これら有機酸の分析をHPLCで行う場合、一般に有機酸はカルボキシ基に基づく紫外200～210 nmにおける吸収しか有しないため、試料に応じて適切な検出法を選択する必要があります。特に、発酵液のように多くの夾雑成分を含む試料においては、短波長域の紫外吸光度検出では有機酸が紫外吸収性夾雑成分の妨害を大きく受けるため、感度に加えて高い検出選択性が必要となります。Nexera有機酸分析システムでは、島津独自のポストカラムpH緩衝化-電気伝導度検出法を採用し、有機酸を高感度かつ選択性良く検出することができます。このため、バイオマス発酵液のような夾雑成分の多い試料の分析に最適なシステムと言えます。

本稿では、Nexera有機酸分析システムを用いて、バイオマス発酵試料および酵母菌培養液における有機酸の経時変化をモニタリングした結果をご紹介します。なお、Nexera有機酸分析システムの原理、流路図につきましては、本誌9ページをご参照ください。

### 1. 分析条件

今回の検討では、カラムとしてShim-pack™ Fast-OAを用いました。Shim-pack Fast-OAは、イオン排除型ポリマー充填剤を用いた有機酸高速分析用カラムです（詳しくは、LCtalk Vol.110をご覧ください）。

有機酸分析カラムの従来品であるShim-pack SCR-102H（2本接続）とShim-pack Fast-OA（3本接続）による有機酸9成分混合標準試料のクロマトグラムを図1に、その分析条件を表1に示します。

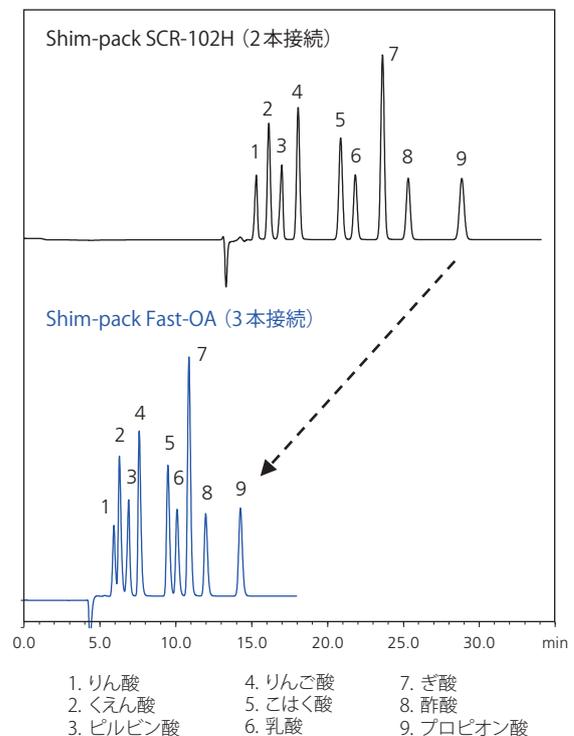


図1 有機酸9成分混合標準試料（各1000 mg/L）のクロマトグラム

表1 分析条件

カラム	
・分析カラム	: Shim-pack SCR-102H (従来品) (300 mm x 8.0 mm I.D., 7 μm) 2本
・ガードカラム	: ガードカラム SCR-102H (従来品) (50 mm x 6.0 mm I.D.)
・分析カラム	: Shim-pack Fast-OA (高速タイプ) (100 mm x 7.8 mm I.D., 5 μm) 3本
・ガードカラム	: Shim-pack Fast-OA (G) (高速タイプ) (10 mm x 4.0 mm I.D.)
移動相	: 有機酸分析移動相試薬セットー移動相
流量	: 1.0 mL/min
pH緩衝化試薬	: 有機酸分析移動相試薬セットーpH緩衝化試薬
混合部	: ミキサー MR 20
温度	: 40 °C
注入量	: 10 μL
検出	: 電気伝導度

## 2. 実バイオマス糖化液発酵試料の分析

実バイオマス糖化液の発酵試料について、有機酸の発酵前および48時間発酵後のクロマトグラムを図2に示します。また、スクリーニング用途でモニタリングした各有機酸の面積値の変化を図3に示します。

ここで用いました酵母菌 (TOYOTA XyloAce™) は、一般に発酵阻害物質と考えられている酢酸をエタノールへ変換でき、その効率が高くなるよう改良されたもので、48時間の発酵により酢酸が97%以上減少していることがわかります。代謝経路の中間で発生した発生阻害物質であるギ酸、乳酸は、増加する傾向が見られました。なお、17分付近には生成したエタノール由来の負ピークが確認できます。

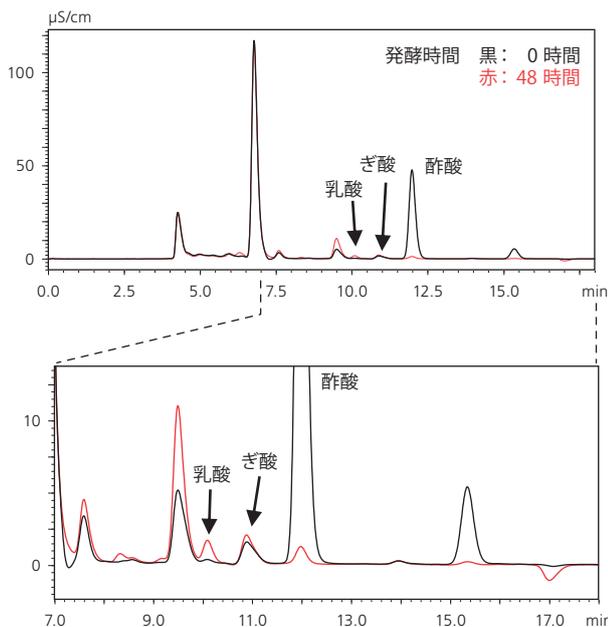


図2 実バイオマス糖化液の発酵試料のクロマトグラム  
(上段:全体、下段:拡大)

面積値

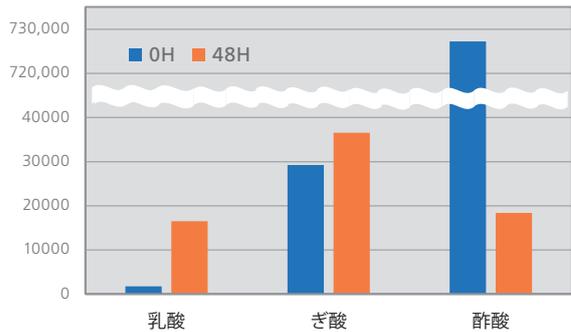


図3 実バイオマス糖化液の発酵前後の各有機酸の面積値の変化

## 3. 草木系バイオマス糖化液発酵試料の分析

草木系バイオマス糖化液を6～40時間発酵させた際のクロマトグラムを図4に、その発酵モニタリング結果を図5に示します。

実バイオマス糖化液と同様に発酵時間の増加と共に酢酸は減少し、ギ酸や乳酸はやや増加しました。通常、夾雑成分と重なりやすい乳酸やギ酸も、Shim-pack Fast-OAカラムの高分離能と高い選択性をもつpH緩衝化-電気伝導度検出法により、細かい経時変化まで確認することができました。

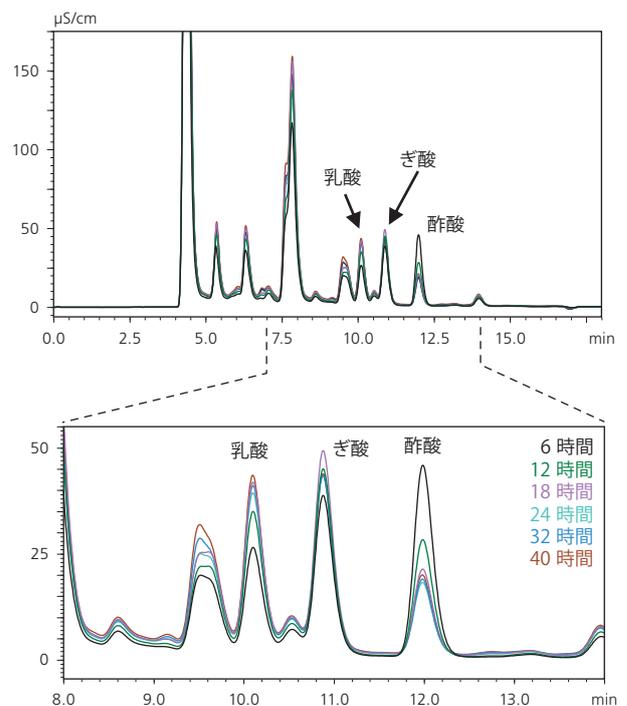


図4 草木系バイオマス糖化液の発酵試料のクロマトグラム  
6～40時間発酵試料の重ね描き(上段:全体、下段:拡大)

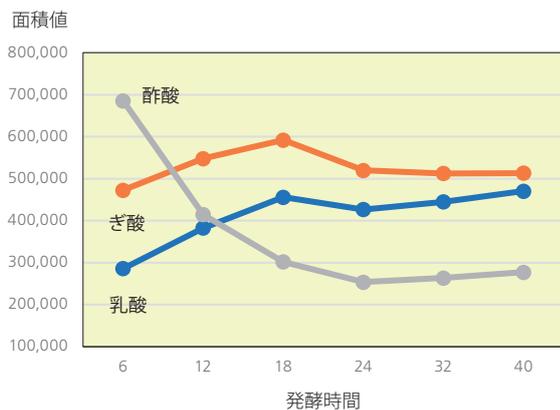


図5 草木系バイオマス糖化液の発酵モニタリング結果

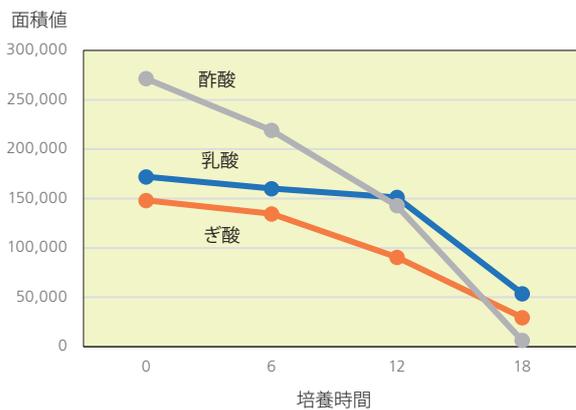


図7 糖蜜培養液の培養モニタリング結果

#### 4. 糖蜜培養液の分析

糖蜜の培養試料のクロマトグラムを図6に、その培養モニタリング結果を図7に示します。

培養時間の増加に伴い、乳酸、ぎ酸、酢酸の大幅な減少が確認できます。これは、培養により酵母菌が増殖することによって糖が欠乏し、酵母菌培養中に副生成された有機酸が代謝されたことを示しています。

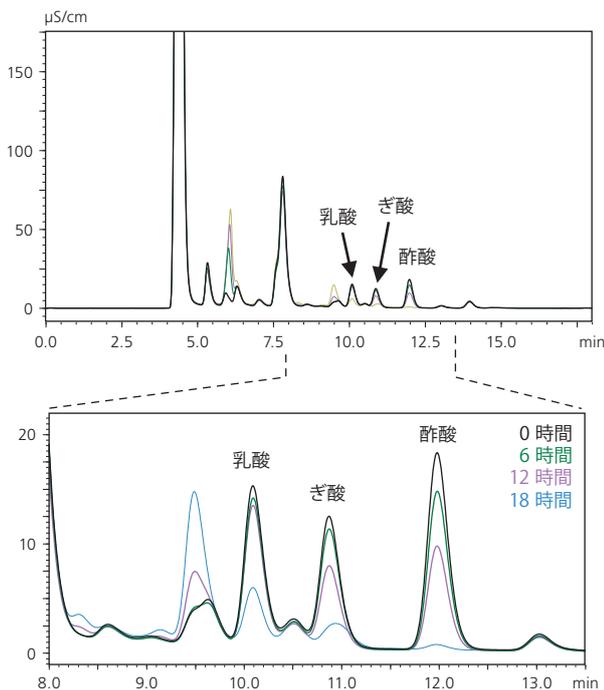


図6 糖蜜培養液のクロマトグラム  
0～18時間培養試料の重ね描き  
(上段:全体、下段:拡大)

#### 5. まとめ

本稿では、Nexera有機酸分析システムとShim-pack Fast-OAカラムの組み合わせにより、夾雑成分の多いバイオマス発酵試料中の有機酸を精度良く、効率的に分析を行った事例をご紹介します。世界的に広く進められているバイオ燃料の研究開発において、本システムは業務効率の向上に大きく貢献すると考えられます。



Nexera有機酸分析システム

※ 本稿の作成にあたりましては、トヨタ自動車株式会社 アグリバイオ事業部 保谷典子様より試料をご提供いただきました。

NexeraおよびShim-packは、株式会社島津製作所の商標です。  
XyloAceは、トヨタ自動車株式会社の米国およびその他の国における商標または登録商標です。