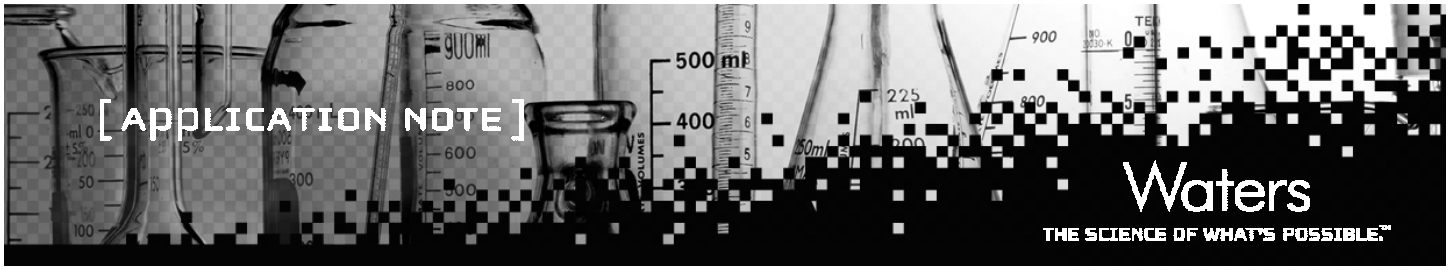


No. 720001896J

発酵エタノールプロセスのための高速HPLC分析

概要

各国で代替燃料に関する法律が制定されつつあり、消費者の関心が増加することによって、公共輸送機関におけるエタノール配合ガソリンの使用を求めるという動きも起こっています。
米国では2005年度に380億ガロン以上のエタノールを生産しており、これは2001年に比べて120%の増加となっています。現在米国では19の州に延べ100以上のバイオエタノール製造工場があり、世界的にはさらに110箇所ほどあります。米国のバイオエタノール製造工場だけでも年間470億ガロンの生産能力があります[2)]。とうもろこしなどを原料とする製造においては、酵素やイーストを利用しスターチと糖をエタノールに変換する発酵プロセスを利用しています。この発酵プロセスの生産性を向上させるためにはイーストの活性に影響するファクタを管理する必要があります。このプロセスにはグルコース・エタノール・乳酸・酢酸の濃度に関するモニタリングが含まれています[3)]。これは発酵条件を最適化するために用いられ、一般的にはHPLC分析法が使われています。典型的なHPLC分析時間は20分～30分です[4)]。
このアプリケーションノートでは高速HPLCによる分析時間10分のメソッドをご紹介します。分析時間の短縮はラボのコスト削減だけでなく、生産工程を細かにコントロールすることにより生産性を向上させることにも貢献します。

サンプルの準備

デキストリン(タイプ1:とうもろこし由来)/マルトトリオース/マルトース(一水和物、グレード1)/グルコース一水和物/L(+)-乳酸(SigmaUltra, 98%)/グリセロール/酢酸(96.0%)/硫酸(ACS試薬)/エタノール
以上すべてSigma-Aldrich(Milwaukee,WI)より購入しました。
エタノール, 工業用標準はMidland Scientific(Omaha,NE)より購入しました。
※デキストリンは少量の低分子量ポリサッカライドを含むポリサッカライドの混合物です[6)]。クロマトグラムによれば、3つ以上のグルコースユニットを持つポリサッカライド92.1%とマルトトリオース2.7%、マルトース1.7%、グルコース2.6%、未同定のオリゴサッカライド0.9%が含まれており、この値は標準濃度の計算に用いられました。

分析条件

装置 ：1515/717plus/2414 HPLCシステム
カラム ：7.8x150mm, IC-Pak™ Ion Exclusion
プレカラム ：6.0x50mm SH-1011P
カラム温度 ：75 ℃
流速 ：1.0 mL/分
移動相 ：0.5mM 硫酸
注入量 ：5μL
RI温度 ：30℃
RI sensitivity ：32
RI time constant ：0.2sec
サプリング速度 ：5ポイント/秒

1515/717Plus/2414
アイソクラティックHPLCシステム

Alliance2695/2414
グラジエントHPLCシステム

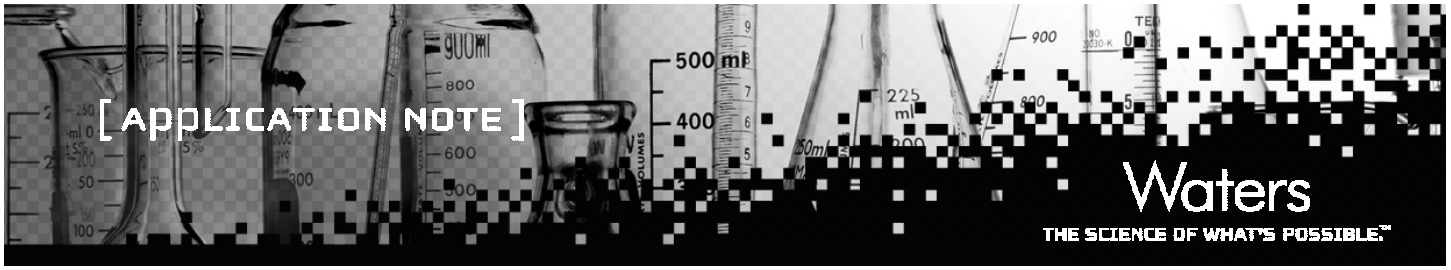
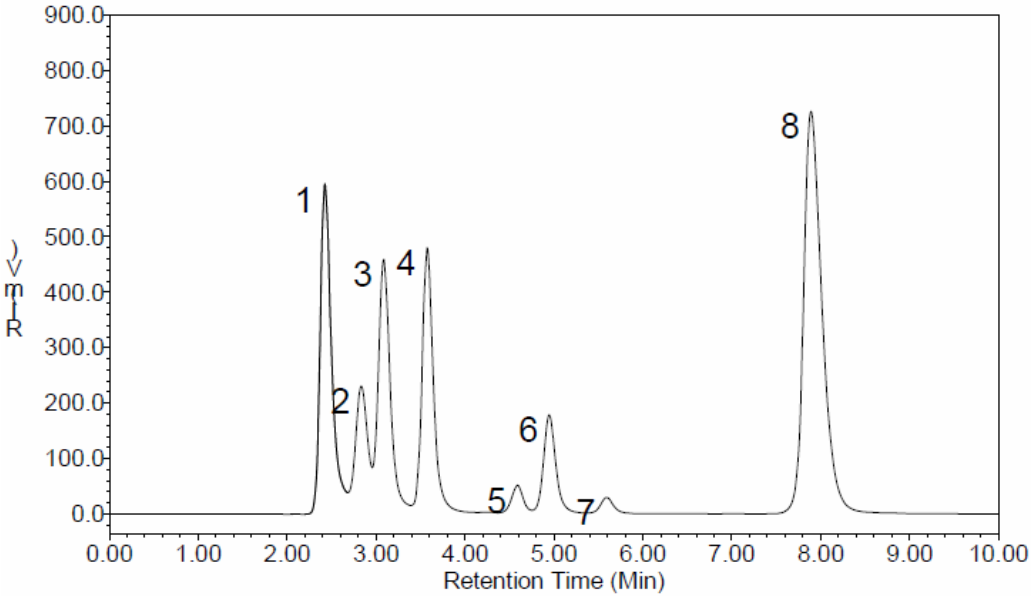


図1. 主成分8化合物のHPLCクロマトグラム



1.デキストリン
2.マルトトリオース
3.マルトース
4.グルコース
5.乳酸
6.グリセロール
7.酢酸
8.エタノール

表1. 各成分の検量線(面積値vs濃度)

Compound	Retention Time (min)	Concentration Range (g/100ml)	R^2	Slope ($x10^5$)	Intercept ($x10^3$)
Dextrin	2.43	0.169 - 3.65	0.9992	17.4	13.4
Maltotriose	2.83	0.0519 -1.12	0.9998	21.1	0.03
Maltose	3.08	0.118 - 2.55	0.9999	22.5	-5.58
Dextrose	3.57	0.111 - 2.39	0.9999	23.1	-8.92
Lactic Acid	4.59	0.0169 -0.363	0.9999	16.4	-2.14
Glycerol	4.95	0.0608 -1.31	0.9999	17.0	-7.49
Acetic Acid	5.59	0.0173 -0.372	0.9999	12.1	-8.31
Ethanol	7.89	0.697 - 5.00	0.9999	8.79	64.1

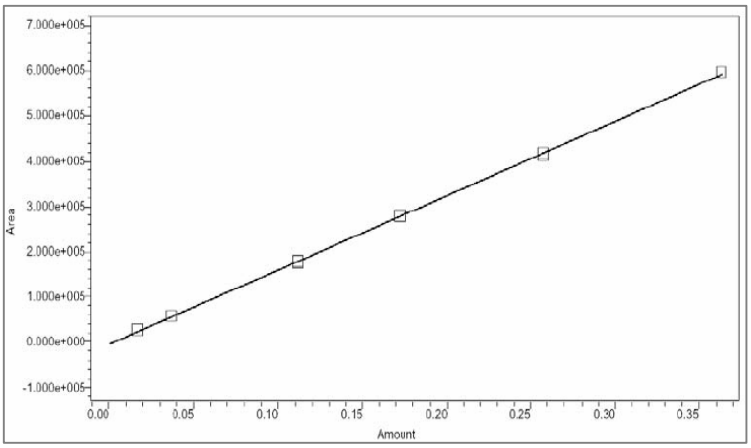
Peak Area = (standard concentration × slope) + intercept

エタノール発酵試料は糖とアルコールを含みます。主な成分としてはデキストリン、マルトトリオース、マルトース、グルコース、乳酸、グリセロール、酢酸、エタノールです。図1にはWatersのHPLCシステムを用いてカラム径・カラム温度・移動相の濃度・流速を最適化して分析したクロマトグラムです。個々のピークは標準試料の分析から同定されました。

表1には検量線情報をまとめたものを示します。面積値に対して濃度をプロットした検量線は表中に示した濃度範囲で直線性が良好でした。ピーク高さを用いた場合にも同様の範囲で直線性が得られました。

図2には乳酸の検量線を示します。

図2. 乳酸の検量線;R^2=0.9999



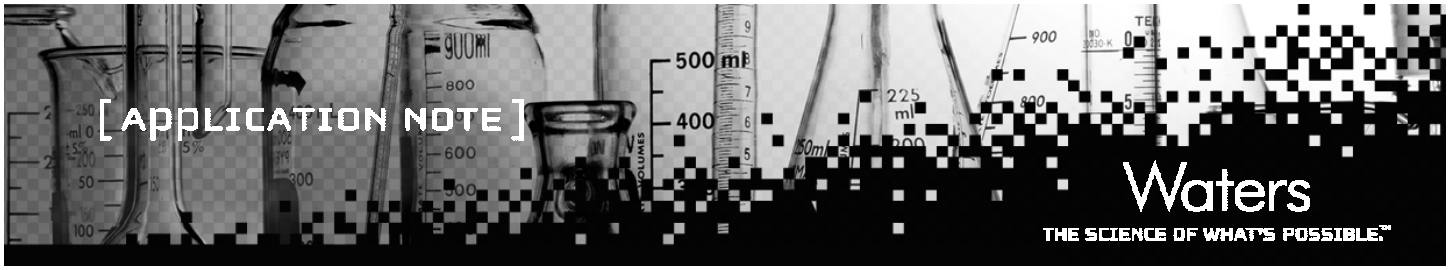


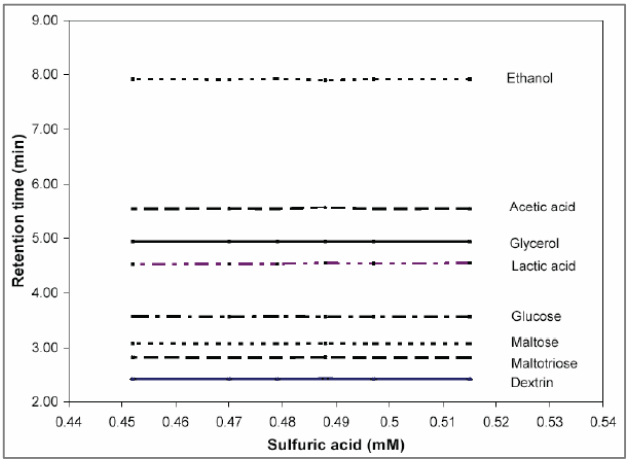
表2. 市販工業用の燃料エタノール標準試料の比較

Component	Vendor's Value (g/100ml)	Analysis Results[1] (g/100ml)	Relative error (%)
Dextrin	3.25	3.076 ±0.017	-5.35
Maltotriose	1.00	1.073 ±0.003	7.30
Maltose	2.00	1.976 ±0.009	-1.20
Glucose	2.00	1.909 ±0.007	-4.55
Lactic Acid	0.30	0.305 ±0.001	1.67
Glycerol	1.00	1.046 ±0.004	4.60
Acetic Acid	0.30	0.289 ±0.002	-3.67
Ethanol	12.00	12.14 ±0.04	1.17

1: Results of 6 measurements. The standard deviation is also shown as the measurement uncertainty.

表2には市販の工業用燃料エタノール標準試料を分析した結果の比較を示します。各6回ずつ注入しています。
いずれのピークの定量結果も±10%以内に収まっています。

図3. 保持時間再現性のまとめ



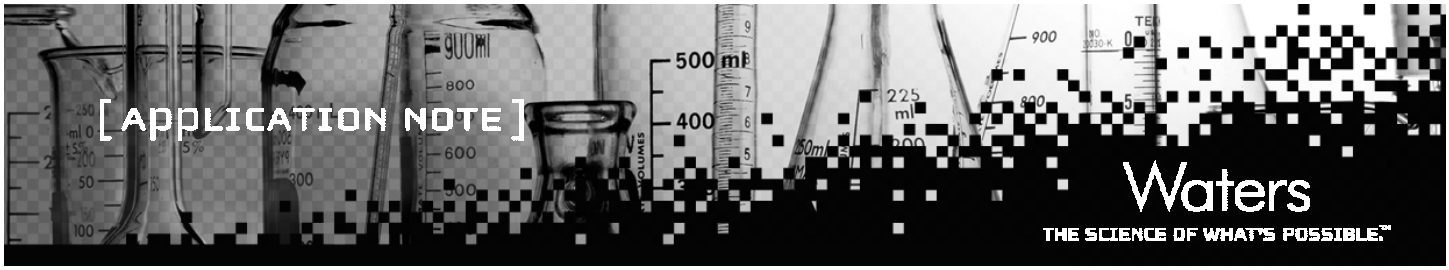
酸性化合物の保持時間は移動相のpH(硫酸の濃度)によって変わります。図3にはこの硫酸濃度を変化させたときの各成分の保持時間の再現性をまとめました。範囲は90%から103%であり、これは0.452mMから0.515mMに相当します。

表3には市販の工業用燃料エタノールを異なる移動相の硫酸濃度で測定した場合の繰り返し再現性を示します。保持時間の平均は±0.7%以内であり、定量結果は±8.7%以内と安定した結果が得られました。

表3. 移動相中の硫酸濃度の変化に対する繰り返し再現性

Component	Concentrations (in g/100ml) measured in different sulfuric acid concentrations[1]					
	0.452mM[2]	0.470mM[3]	0.479mM[2]	0.488mM[2]	0.497mM[4]	0.515mM[3]
Dextrin	2.999 ± 0.020	3.008 ± 0.013	3.018 ± 0.026	2.983 ± 0.026	3.034 ± 0.013	2.995 ± 0.023
Maltotriose	1.064 ± 0.008	1.068 ± 0.006	1.066 ± 0.008	1.061 ± 0.008	1.074 ± 0.005	1.064 ± 0.009
Maltose	1.937 ± 0.012	1.950 ± 0.009	1.942 ± 0.016	1.948 ± 0.014	1.958 ± 0.009	1.932 ± 0.014
Glucose	1.870 ± 0.012	1.885 ± 0.009	1.875 ± 0.015	1.883 ± 0.013	1.892 ± 0.008	1.865 ± 0.015
Lactic Acid	0.306 ± 0.002	0.307 ± 0.002	0.304 ± 0.002	0.304 ± 0.002	0.304 ± 0.001	0.301 ± 0.002
Glycerol	1.017 ± 0.006	1.026 ± 0.005	1.022 ± 0.008	1.024 ± 0.007	1.030 ± 0.005	1.016 ± 0.008
Acetic Acid	0.275 ± 0.002	0.280 ± 0.003	0.274 ± 0.002	0.280 ± 0.002	0.276 ± 0.002	0.274 ± 0.003
Ethanol	11.930±0.072	12.025±0.057	12.016±0.083	12.005±0.088	12.065±0.057	11.935±0.097

1: The standard deviation is shown as uncertainty. 2: Number of measurement is 30. 3: Number of measurement is 20. 4: Number of measurement is 21.



まとめ

WatersのHPLCと最適化された分析条件によって、分析時間わずか10分の燃料エタノール発酵成分の分析が可能になりました。市販の工業用燃料エタノールの分析において精密かつ正確な定量結果が得られました。
分析時間の短縮化は生産性を向上させコスト削減にも貢献します。

参考文献

1. Hileman, B. Energy for a Sustainable Future, C&EN. 84:7, 70-75, 2006.
2. Renewable Fuels Association Home Page: www.ethanolrfa.org.
3. Kohl, S. "Ethanol 101-5: Managing Stress Factors", Scott Kohl, Ethanol Today, 1:36-37, 2004.
4. *Optimizing Ethanol Production with High Performance Liquid Chromatography*, Waters Application Note no. 720000455EN.
5. Data were acquired using a 1525 Binary pump because the system was available. Since this method uses isocratic elution, a 1515 HPLC pump is suitable for this application.
6. Personal communication with vendor; product contains approximately 10% low molecular weight fraction.
7. Composition of the dextrin, maltotriose, maltose, and an unidentified impurity were estimated by the peak areas of each component. No adjustments were made for differences in RI response factors.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡