

## LC/MSD iQ による短鎖および中鎖脂肪酸の分析



### 著者

林 慶子

アジレント・テクノロジー株式会社

### 要旨

一般に短鎖や中鎖の脂肪酸（カルボン酸）は誘導体化することで GC/FID または GC/MS で測定することができます。一方 HPLC で分析を行う場合には、短鎖脂肪酸は親水性が高いため通常の逆相系での保持が困難であり、また UV 検出では選択性が低いため直接分析が困難です。LC/MS で分析する場合にも一般的には誘導体化が必要とされます。

本アプリケーションノートでは C3 から C8 の直鎖カルボン酸を誘導体化せず、LC/ESI-MS で高感度に分析する方法を検討しました。親水性化合物の保持に優れたカラムと、比較的熱の影響を与えにくい構造のアジレントの ESI イオン源を用いて条件を構築しました。

## はじめに

短鎖や中鎖の脂肪酸（カルボン酸）は親水性が高く揮発性が高い化合物です。保持や検出の問題を解決するために一般的には、誘導体化して測定されます。

LC/MS で直接分析する場合にはイオン排除カラムを用いた方法<sup>1)</sup>がありますが、カラムが高価である難点があります。また、有機酸を逆相分離する場合には化合物の保持を制御する目的で移動相に酸や高濃度の塩を添加します<sup>2)</sup>。いずれの方法も分離に優れる一方、移動相に添加した酸や高濃度の塩は、イオン化を阻害するため感度が犠牲になります。

ここでは C3 から C8 の直鎖カルボン酸を LC/ ESI-MS で高感度に分析するために、親水性化合物の保持に優れたカラムを使用し、低濃度の酢酸アンモニウム水溶液で分離条件を検討しました。揮発性化合物はイオン源温度の影響を受けると考えられているため、比較的熱の影響を受けにくい構造のアジレントの ESI イオン源を検討に用いることで直接分析を試みました。さらに、イオン源の乾燥ガス温度が感度に与える影響を評価しました。

次に、構築した条件で各化合物の直線範囲を確認し、定量分析に応用可能であるか評価しました。

## システム

1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7104A)  
1260 Infinity II バイアルサンブラ (G7129C) + ICC  
InfinityLab LC/MSD iQ

分析とデータ解析には OpenLab CDS 2.7 を使用しました。

## 試料調製

プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸は東京化成から購入しました。カルボン酸類は 1000 mg/L になるようメタノールに溶解しました。1000 mg/L 標準試料はメタノールで混合および希釈し分析に供しました。

## 分析条件

表 1. 分析条件

LC	
カラム	InfinityLab Poroshell 120 HPH-C8 3.0x150 mm, 2.7 μm (p/n, 693975-506)
カラム温度	35 °C
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム
移動相 B	メタノール
グラジエント	0 %B (0 min) – 95 %B (8 min)
流速	0.5 mL/min
注入量	5 μL
MS	
乾燥ガス	10 L/min, 200 °C
ドライガス温度	50 psi
キャピラリー電圧	3500 V
極性	負
SIM	表 2 参照

表 2. SIM 設定

化合物	炭素数	m/z	Fragmentor (V)
プロピオン酸	3	73	90
酪酸	4	87	90
吉草酸	5	101	90
カプロン酸	6	115	90
エナント酸	7	129	90
カプリル酸	8	143	90

## 結果

1 mg/L 混合試料のクロマトグラムを図 1 に示しました。すべての化合物ピークを分離し、プロトン脱離イオンで直接検出することが可能でした。炭素鎖長の長い化合物（＝疎水性の高い化合物）ほど保持が強い傾向にあり、保持が強いピークほどより感度が得られる傾向にあることがわかりました。ESI における脱溶媒効率、一般的に有機溶媒比率が高いほど良好であるとされているため、保持が強い脂肪酸（＝溶出時の有機溶媒比率が高い）ほど良好な感度が得られたと考えられます。

しかし、本実験で用いた化合物は鎖長の異なる直鎖モノカルボン酸であるため、各化合物の分子量や揮発性の違いが感度に影響する可能性も考えられます。次に、鎖長と感度の影響を比較するため乾燥ガス温度を変更して分析を実施しました。

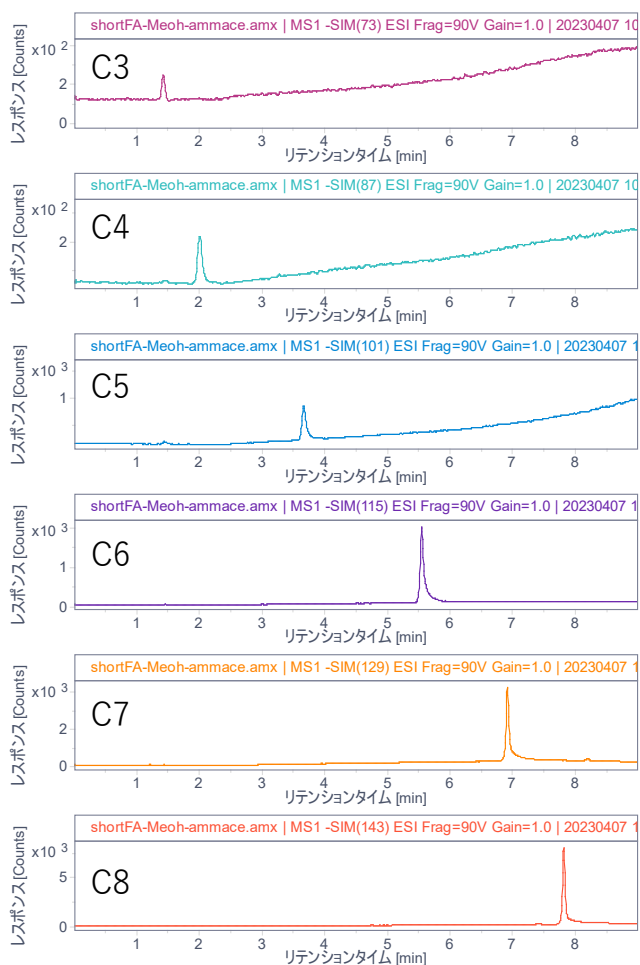


図1. 1 mg/L 混合試料のクロマトグラム  
上からプロピオン酸 C3、酪酸 C4、吉草酸 C5、カプロン酸 C6、エナント酸 C7、  
カプリル酸 C8

乾燥ガス温度設定を比較的低温の 200 °C と設定最大温度の 350 °C に変更した場合のプロピオン酸 (C3)、酪酸 (C4)、吉草酸 (C5) およびカプロン酸 (C6) のクロマトグラムを図 2 に示しました。C3 から C5 では乾燥ガス温度 200 °C (赤) においてピーク高さが高くなりましたが、C6 では乾燥ガス 350 °C において良好なピーク高さとなりました。表 3 に乾燥ガス温度 200 °C と 350 °C における各ピークのピーク高さや S/N を示しました。その結果、短鎖の脂肪酸は乾燥ガス温度が高くなると感度が低下し、一方 C6 から C8 の中鎖脂肪酸では高温のイオン化条件で良好な結果が得られることがわかりました。

さらに乾燥ガス温度を 150 °C まで下げて分析してみると、1 mg/L でのプロピオン酸の S/N は 12、酪酸は 32 でした。極端な低温条件では脱溶媒効率が低下するため、イオン化効率が悪くなり感度の低下が起ることがわかりました。

次に既報データと感度を比較しました。酪酸 1 mg/L における感度は、イオン排除 LC/MS 法<sup>1)</sup>では S/N=18、有機酸分析逆相分配 LC/MS 法<sup>2)</sup>で S/N=10 でした。本法は乾燥ガス 200 °C において 1 mg/L で S/N=44 であるため、短鎖脂肪酸の検出において従来法よりも高い感度が得られることが示されました (図3)。

表 3. 乾燥ガス温度を 200 °C および 350 °C に設定した場合の 1 mg/L におけるピーク高さや S/N

炭素数	名前	200 °C		350 °C	
		高さ	S/N	高さ	S/N
3	プロピオン酸	130	26	77	19.2
4	酪酸	165	44	93	37
5	吉草酸	632	87	445	61
6	カプロン酸	1910	357	1864	410
7	エナント酸	3918	471	4499	574
8	カプリル酸	7717		9943	

(注) カプリル酸はピーク近傍の不純物ピークが存在したため S/N を算出しませんでした。

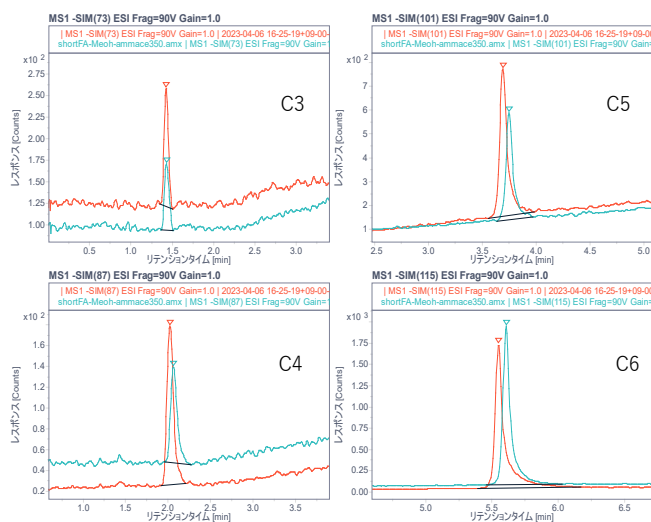


図 2. C3 から C6 脂肪酸の 1 mg/L 試料のクロマトグラム (赤:200 °C、緑:350 °C)

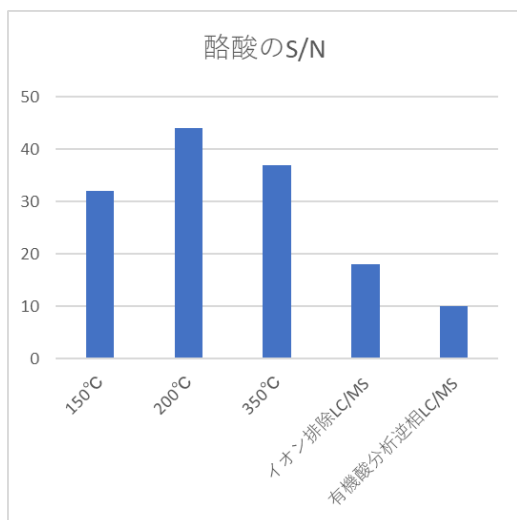


図 3. 各測定条件における酪酸の S/N

作成した分析条件の定量性検証のために、希釈系列を作成し分析を行いました。その結果、広い濃度範囲における直線性応答が得られ、すべての化合物で決定係数 0.999 の良好な直線が示されました (表 4)。

表 4. 各化合物の直線範囲

化合物	直線性範囲 (mg/L)	決定係数 (R2)
プロピオン酸	0.5-10	0.999
酪酸	0.1-10	0.999
吉草酸	0.05-10	0.999
カプロン酸	0.01-10	0.999
エナン酸	0.0025-10	0.999
カプリル酸	0.0025-10	0.999

## まとめ

短鎖脂肪酸を誘導体化せず直接 LC/MS で分析しました。乾燥ガス温度を比較的低温に設定することで短鎖カルボン酸類を良好に検出しました。アジレントの ESI イオン源は熱の影響が穏やかであるため揮発性が高いカルボン酸類を直接イオン化し検出することが可能でした。

酢酸、ジカルボン酸およびトリカルボン酸がターゲットになる場合にはイオン排除 LC/MS 法<sup>1)</sup> か有機酸分析 LC/MS<sup>2)</sup> 法を参照ください。

## References

1. イオン排除-LC/MS による有機酸の分析、アジレント・テクノロジー アプリケーションノート、LC-MS-201611HK-001
2. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ による有機酸の分析、アジレント・テクノロジー アプリケーションノート、5994-5348JAJP

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE16340786

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2023  
Printed in Japan, June 8, 2023  
5994-6435JAJP