

Agilent InfinityLab LC/MSD iQによる 有機酸の分析



著者

野田 莉帆

内藤 厚子

城代 航

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

有機酸は極性が高いため、HPLC 分析にはイオン排除カラムが多用されます。イオン排除カラムと LC/MS を組み合わせた分析は既報¹の通り、選択性に優れたメソッドですが、カラムは高価で、取り扱いに注意が必要です。また、逆相モードでの分析例では不揮発性移動相であるリン酸を用いた例が多く紹介されていますが、MS に適合性のない移動相であり、低波長の UV 検出では夾雑ピークとの判別が困難であるなどの問題があります。

本アプリケーションノートでは、一般的な逆相カラムと揮発性移動相を用いて、有機酸の LC/MS 分析を行いました。対象の 14 有機酸について、良好なピーク形状で分析可能でした。

分析条件

装置

1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
 1260 Infinity II マルチサンブラ (G7167A)
 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
 InifinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

標準品およびサンプル調製

標準品：酒石酸、キナ酸、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、酢酸、コハク酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*iso*-酪酸、*iso*-吉草酸、*n*-吉草酸 は 0.1 % ギ酸含有水溶液、フマル酸はメタノールで 10 mg/mL となるよう溶解させた後、0.1 % ギ酸含有水溶液で各濃度に希釈しました。

サンプル：0.1 % ギ酸含有水溶液で 10 倍希釈した後、0.2 μm フィルタろ過しました。その後 0.1 % ギ酸含有水溶液で希釈しました。

分析条件

分析条件を表 1 に示します。逆相カラムを使用し、SIM モードで分析を行いました。表 2 に SIM モニターイオンおよび保持時間を示します。モニターイオンはプロトン脱離もしくはギ酸付加イオンとしました。

表 1. 分析条件

LC			
移動相 A	0.01 % ギ酸含有水溶液		
移動相 B	100 mM ギ酸アンモニウムを含む 60 % アセトニトリル水溶液		
カラム温度	40 °C		
注入量	5 μL		
カラム	InertSustain AQ-C18 メタルフリー 2.1 x 100 mm, 1.9 μm (GL Sciences)		
グラジエント	Time	B%	流速
	min		mL/min
	0	0	0.1
	2	0	0.1
	12	60	0.1
	20	90	0.1
	20.1	0	0.3
	27	0	0.3
MS			
イオン化	ESI-Negative		
ドライガス	12.0 L/min at 200 °C		
ネブライザ圧力	60 psi		
キャピラリー電圧	3500 V		
フラグメンタ電圧	50 V		

表 2. モニターイオンおよび保持時間

化合物名	モニターイオン (m/z)		保持時間 (min)
酒石酸	149	[M-H] ⁻	2.9
キナ酸	191	[M-H] ⁻	3.1
ピルビン酸	87	[M-H] ⁻	3.5
リンゴ酸	133	[M-H] ⁻	3.8
乳酸	89	[M-H] ⁻	5.0
クエン酸	191	[M-H] ⁻	5.6
酢酸	105	[M+HCOO] ⁻	5.8
フマル酸	161	[M+HCOO] ⁻	6.3
コハク酸	117	[M-H] ⁻	9.0
プロピオン酸	119	[M+HCOO] ⁻	14.1
<i>n</i> -酪酸	133	[M+HCOO] ⁻	17.1
<i>iso</i> -酪酸	133	[M+HCOO] ⁻	17.3
<i>iso</i> -吉草酸	147	[M+HCOO] ⁻	19.5
<i>n</i> -吉草酸	147	[M+HCOO] ⁻	20.0

結果

図 1 に標準品 SIM クロマトグラムを、表 3 に検量線結果を示します。すべての化合物で良好なピーク形状および直線性を確認しました。また、1 mg/L における保持時間の相対標準偏差は 0.3 %、面積値の相対標準偏差は最大 4.7 % と良好な再現性を確認しました。

表 3. 検量線結果および 1 mg/L における面積相対標準偏差 (%)

化合物名	検量線範囲 mg/L	決定係数	1 mg/L Area RSD %
酒石酸	0.025 – 1	0.99935	0.85
キナ酸	0.025 – 1	0.99577	0.24
ピルビン酸	0.025 – 5	0.99976	1.63
リンゴ酸	0.01 – 1	0.99678	1.15
乳酸	0.01 – 2.5	0.99803	1.61
クエン酸	0.1 – 5	0.99838	2.91
酢酸	0.5 – 50	0.99961	2.73
フマル酸	0.01 – 1	0.99625	1.51
コハク酸	0.01 – 1	0.99778	0.55
プロピオン酸	0.25 – 100	0.99989	4.73
<i>n</i> -酪酸	1 – 100	0.99922	2.92
<i>iso</i> -酪酸	1 – 100	0.99844	2.40
<i>iso</i> -吉草酸	0.5 – 100	0.99998	2.56
<i>n</i> -吉草酸	0.5 – 100	0.99919	2.35

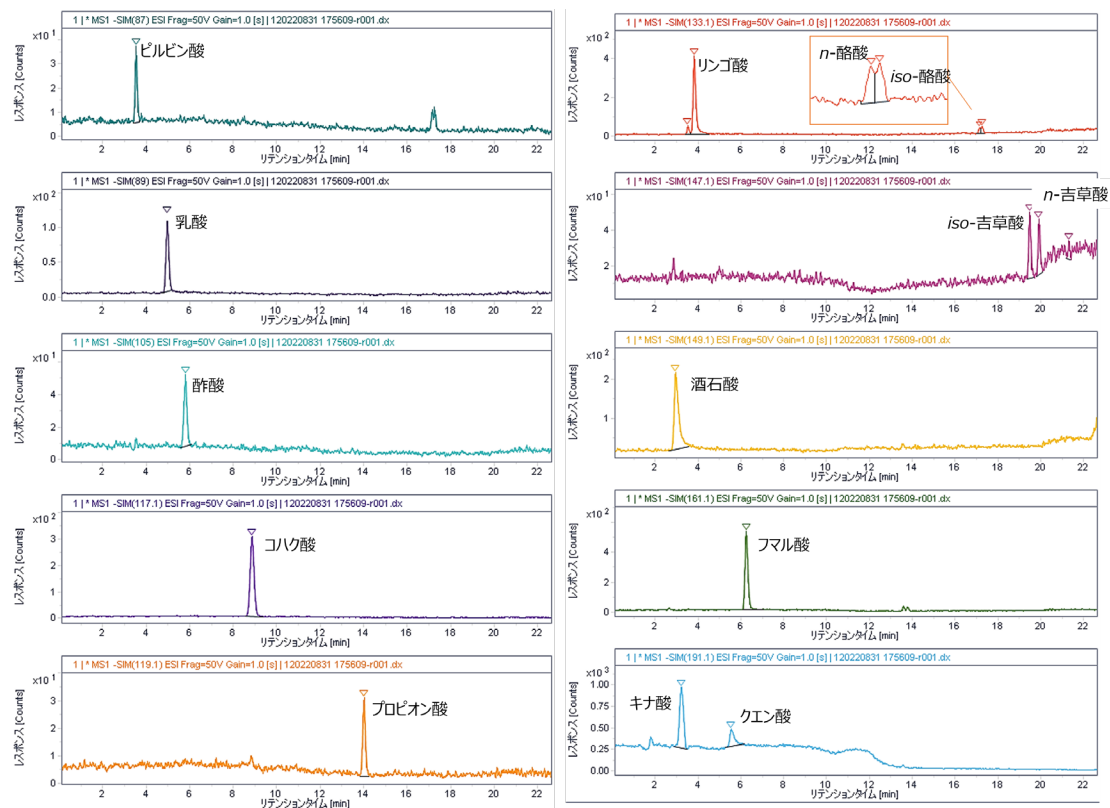


図 1. 標準品 SIM クロマトグラム (酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*iso*-酪酸、*iso*-吉草酸、*n*-吉草酸は 1 mg/L、その他 0.1 mg/L)

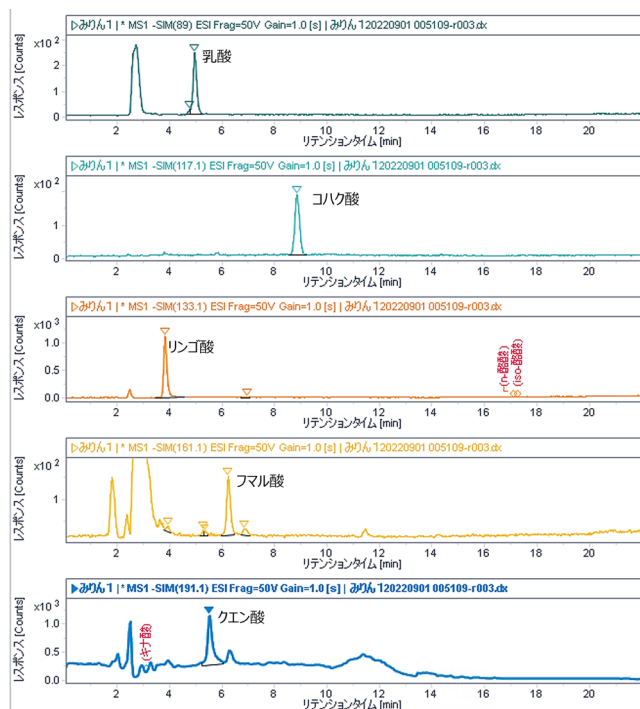


図 2. みりんから検出された有機酸 SIM クロマトグラム

実サンプルとして、市販のみりんを分析しました。みりんの SIM クロマトグラムを図 2 に示します。5 種の有機酸を検出しました。添加回収率は 200 倍希釈したみりん、200 倍希釈したみりんに 0.25 mg/L 標準品を添加したサンプル、0.25 mg/L 標準品の面積値より算出しました。定量値および添加回収率を表 4 に示します。サンプルから検出された有機酸の回収率は 80–120 % でした。

表 4. サンプル結果

化合物名	定量値 (原液換算) mg/L	回収率 %
リンゴ酸	30.8	86.5
乳酸	27.8	112.2
クエン酸	25.6	81.7
フマル酸	2.6	120.4
コハク酸	6.1	104.5

まとめ

逆相カラムを用いて有機酸の LC/MS 分析を行いました。14 種の有機酸において良好な直線性および再現性を確認しました。また、サンプル中からも有機酸を検出し、良好な回収率を得られました。

参考

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](#)

ホームページ

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

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いません。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。

DE36535176

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, September 15, 2022

5994-5348JAJP