

低分子有機酸のイオン排除液体クロマトグラフィー／質量分析法

蒲生 啓司, 齋藤 尋輝

(高知大学大学院教育学研究科教科教育専修理科教育専攻化学)

Ion Exclusion Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Analysis of Low Molecular Organic Acids

Keiji GAMOH and Hiroki SAITOH

Graduate School of Education, Kochi University

Abstract : Ion exclusion liquid chromatography/mass spectrometric (LC/MS) analytical method of low molecular organic acids has been developed. Successful separation and detection of a mixture of acetic, propionic, butyric, glycolic, lactic, 2-hydroxybutyric, malonic, succinic, glutaric, tartaric and citric acids have been performed by on an improved ion exclusion column, which is semi-rigid styrene-divinylbenzene copolymer-based H-type cation exchange resin (ULTRON PS-80H), and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Formic acid or acetic acid was used as a mobile phase to separate the above carboxylic acids within 15 min. The ESI interface was used in both positive and negative ionization mode for LC/MS. ESI produced reasonable signals from positive ions ($[M+NH_4]^+$) of acetic, propionic and butyric acids and from negative ions ($[M-H]^-$) of glycolic, lactic, 2-hydroxybutyric, malonic, succinic, glutaric, tartaric and citric acids. The effects of ionization parameters, source temperature, capillary voltage and cone voltage, on sensitivity and linearity were examined. Linear plots of peak area versus concentration were obtained over the ranges 2.0 - 40 mM for acetic, propionic and butyric acids, and 0.5 - 40 μ M for the others for MS detection. The detection limits of the target carboxylic acids calculated at S/N=3 ranged from 0.02 - 1.6 mM for acetic, propionic and butyric acids, and from 0.09 - 0.44 μ M for the others. The reproducibility of retention times and peak areas were 0.55 - 1.25% and 0.85 - 2.45%, respectively. The effect of a polar organic solvent, methanol or acetonitrile, which was used as an additive to mobile phase, was also examined. Increase of the detection sensitivities of both succinic and citric acids was observed when methanol was used as the additive at the concentration of 5-10% (v/v).

キーワード : 低分子有機酸, イオン排除クロマトグラフィー, エレクトロスプレーイオン化, LC/MS.

Keywords : low molecular organic acid, ion exclusion chromatography, electrospray ionization, LC/MS.

1 緒 言

近年、酸性降下物などの環境汚染モニタリングの対象として有機酸の測定が行われるようになり¹⁻³⁾、また一方で有機酸は、食品中に味成分として多く含まれ、品質管理上重要な意味を持つ成分として知られてきた⁴⁾。更に各種疾患時において、血中の有機酸存在比が平常時とは異なるパターンで現れることがわかっており、有機酸が体内のコレステロール値を下げる働きや癌の予防に役立つことと併せて、保健や医療面においてもその分析の意義は大きい⁵⁾。従来有機酸の測定には、イオンクロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーによる分析法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた紫外領域の直接検出法⁶⁾、また紫外誘導体化や蛍光誘導体化と組み合わせた HPLC 分析法^{7,8)} が用いられてきたが、いずれも分離や感度の面から十分に満足されるものではなかった。液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 分析法は、高感度な分析が可能であることと、物質の同定に有効なマススペクトル情報が得られることから、有力な分析手段として非常に多くの分野で用いられている。著者らは先に、三輪らの有機酸プレ誘導体化法⁹⁾、即ち有機酸を2-ニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 (2-NPH·HCl) と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (1-EDC·HCl) の存在下で反応させて得られる酸ヒドラジドを、質量分析的に高感度検出する LC/MS 分析法を報告したが¹⁰⁾、二塩基酸及び三塩基酸については適応できていない。

低分子有機酸の分離に際しては、古くからイオン排除モードに基づく分離が使われてきた。Houk らによってイオン排除クロマトグラフィーとエレクトロスプレイイオン化 (ESI) による LC/MS 法が報告されたが¹¹⁾、段数が低く検出下限はせいぜい2-8 ppmとそれほど高いものではなかった。また大気圧化学イオン化 (APCI) 法による低分子有機酸の分析法も Helaleh らによって報告されたが¹²⁾、対象としている有機酸がモノカルボン酸だけであり、検出感度の点からも実用の域に達しているとは言い難い。著者らは、低分子有機酸に対する高感度微量分析法を提供する目的から、イオン排除モード対応のセミマイクロカラムの開発を行い、エレクトロスプレイイオン化法に基づく低分子有機酸の LC/MS 法の有用性を報告した¹³⁾。本研究では、個々の低分子有機酸定量のための更なる分析条件の最適化を行うと共に、移動相に添加する極性溶媒の、検出感度に与える影響を明らかにすべく検討を加えた。その結果、定量下限及び再現性の点で実用的に対応できる結果を得たので報告する。

2 実 験

2・1 試 薬

本研究で対象とした有機酸は、酢酸、2-ヒドロキシ酪酸、マロン酸、酒石酸及びクエン酸は和光純薬工業製、プロピオン酸、酪酸、乳酸及びコハク酸は SIGMA 製、及びグリコール酸及びグルタル酸は東京化成工業製を、いずれも市販のナトリウム塩を用いた。これらの有機酸は全て100 mMの水溶液として調製後、適宜希釈してその10 μ l をカラムに注入した。移動相溶媒等、他の試薬は全て市販の試薬特級を使用し、純水は Milli-Q システムにより精製したものを用いた。

2・2 装置及び分析条件

LC の送液部に、PU-980 (日本分光製) を用い、カラム恒温槽として U-620VP (スガイケミー製) を用いカラム温度を55 $^{\circ}$ C に設定した。検出器には、質量分析計 (VG Quattro II, micromass 製) を接続して用いた。イオン排除モードの分離カラムとして、スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂 (H) 型 (平均粒子径10 μ m) を、高圧スラリー法によりステンレス管 (2.0 mm i.d. \times 250 mmL) に充填したセミマイクロカラム (ULTRON PS-80H, 信和化工製) を用いた。移動相として、

ギ酸又は酢酸水溶液を0.1~0.5% (v/v)の濃度で用い、流量を0.07 ml/minとした。質量分析部のイオン化法としてエレクトロスプレイイオン化 (ESI) 法を用い、ESI法におけるイオン源温度、キャピラリー電圧及びコーン電圧は各試料の最適値を設定した上で、正イオン及び負イオン化モードでマススペクトルを記録した。マススペクトルの測定には全イオンモニタリング (TIM) モードを使用し、その測定質量範囲はm/z 30~300、スキャン時間を1秒とした。また、定量下限の測定は、選択イオンモニタリング (SIM) モードで行った。SIM測定では、ギ酸 (FA, m/z 64)、酢酸 (AA, m/z 78)、プロピオン酸 (PA, m/z 92) 及び酪酸 (BA, m/z 106) からは正イオン化モードにより $[M + NH_4]^+$ イオンを、グリコール酸 (GlyA, m/z 75)、乳酸 (LA, m/z 89)、2-ヒドロキシ酪酸 (2-HBA, m/z 103)、マロン酸 (MA, m/z 103)、コハク酸 (SA, m/z 117)、グルタル酸 (GluA, m/z 131)、酒石酸 (TA, m/z 149) 及びクエン酸 (CA, m/z 191) からは負イオン化モードにより $[M - H]^-$ イオンを最適イオン種として検出した。

3 結果及び考察

3.1 移動相の選択

イオン排除クロマトグラフィーでは、主にリン酸、過塩素酸及び硫酸などの鉱酸が用いられるが、エレクトロスプレイイオン化に適さず、インターフェースへのダメージを考えるとこれらの酸を移動相として使うことはできない。ここでは、エレクトロスプレイイオン化に対応できかつ低分子有機酸の分離を可能にする移動相として、ギ酸及び酢酸を用いて検討した。ギ酸を移動相として、その濃度を0.1, 0.2及び0.5% (v/v) と変化させた時の、プロピオン酸、2-ヒドロキシ酪酸、コハク酸及びクエン酸の挙動を比較した。マロン酸、コハク酸及びグルタル酸のシグナルに若干のテイリングが見られたが、ギ酸濃度を変えても変化は無かった。その他の有機酸についても、保持時間及びピーク形状については際立った変化は見られなかったが、検出の感度については、ギ酸濃度が増加するにつれていずれも低下する傾向が見られた (Fig. 1)。また、0.1% (v/v) の濃度でギ酸と酢酸を用いて各有機酸の保持時間を比較したところ、Fig. 2 に示したように、保持時間に僅かの差が

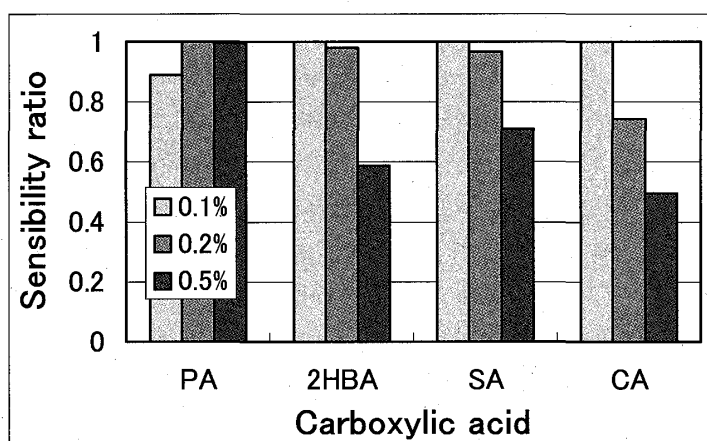


Fig. 1.

Effect of concentration of formic acid as a mobile phase on ion currents of the carboxylic acids as their base peaks. MS conditions for PA: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70 °C; capillary voltage, 3.5 kV; cone voltage, 10 V; MS conditions for the others: ESI-MS interface in the negative mode; source temperature, 90 °C; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V. Sample concentration, 10 mM for PA and 1 mM for the others.

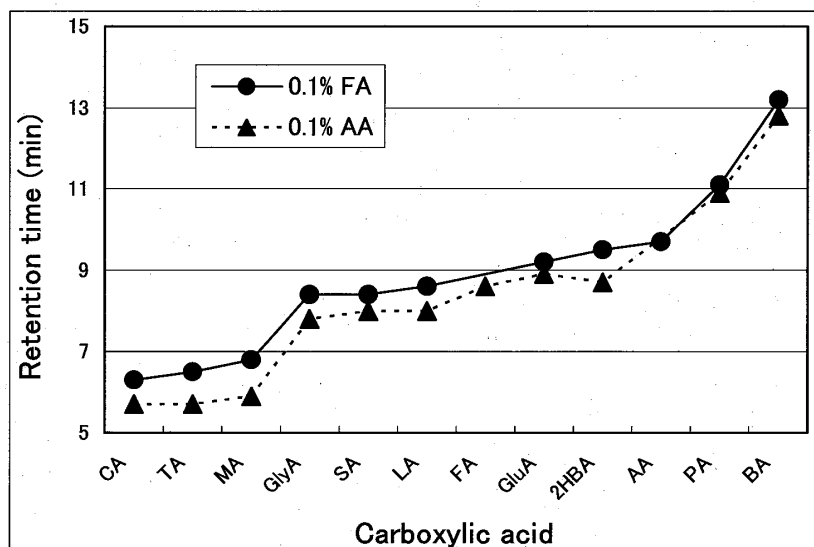


Fig. 2.

Comparison of retention times of the carboxylic acids with formic acid and acetic acid as the mobile phase. LC/MS Conditions: column, ULTRON SP-80H; column temperature, 55 °C; mobile phases, 0.1% (v/v) formic acid and acetic acid; flow rate, 0.07 mL/min; detection, MS detection using ESI-MS interface. Sample concentration, 10 mM for AA, PA and BA, and 1 mM for the others.

観察されたもののほとんど同一の挙動を示した。しかし酢酸を移動相とした場合に、全ての有機酸に対して感度を低下させることがわかったため、本研究での移動相を0.1% (v/v) のギ酸とした。

3・2 イオン化モードの選択とマススペクトル

LC/MS法では、各有機酸がどのようなイオン形態で検出され、またどのようなイオン種をベースピークとするのかという基本的な情報が必要である。ここでは、エレクトロスプレイイオン化法における正及び負双方のイオン化モードで、全ての有機酸について質量スペクトルを測定した。その結果を検出イオン種の相対強度と共に Table 1 及び Table 2 にまとめた。その結果、正イオン化モードでは全ての有機酸において、 $[M + NH_4]^+$ イオンが分子関連イオンとしてベースピークとして検出され、又負イオン化モードでは $[M - H]^-$ イオンを分子関連イオンとしてやはりベースピークとして検出されることがわかった。 $[M + NH_4]^+$ イオンの出現は、移動相に用いているギ酸もしくは水中に含まれる微量のアンモニウムイオンによるものと思われるが、イオン源を洗浄しても或いは水を換えてもイオン強度として変わることはなかった。

更に Fig. 3 に示すように、ピーク面積の結果からは、酢酸、プロピオン酸、及び酪酸については、圧倒的に $[M + NH_4]^+$ イオンの方が $[M - H]^-$ イオンよりも大きい強度で得られ、またクエン酸については若干 $[M + NH_4]^+$ イオンの方が大きかったが、他の有機酸については、 $[M - H]^-$ イオンの方が大きい強度で得られることがわかった。特に酪酸までのアリファティックモノカルボン酸については、アルキル基の増加に伴って正イオン化モードでの感度が格段に増加することから、定量の際のベースピークとして $[M + NH_4]^+$ イオンを用いることとした。これ以外の有機酸については、負イオン化モードにおいて極性基の存在が $[M - H]^-$ イオンの出現効率を高めることから、これを定量の際のベースピークとした。クエン酸のみが極性基が多い割には、例外的に $[M - H]^-$ イオンよりも $[M + NH_4]^+$ イオンの強度が大きい。この理由については現在のところ不明である。有機酸11種混合試料

Table 1 Relative intensities of the positive-ions in ESI mass spectra of the carboxylic acids

Carboxylic acid	Retention time (min)	m/z [relative intensity (%)]		
		[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+H ₂ O+NH ₄] ⁺
AA	9.7	61 (11)	78 (100)	96 (46)
PA	11.1	75 (4.0)	92 (100)	110 (14)
BA	13.2	89 (5.3)	106 (100)	124 (23)

LC/MS conditions: column, ULTRON SP-80H; column temperature, 55 °C; mobile phase, 0.1% (v/v) formic acid; flow rate, 0.07 mL/min; detection, MS detection using ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70 °C; capillary voltage, 3.5 kV; cone voltage, 10 V; sample concentration, 10 mM each.

Table 2 Relative intensities of the negative-ions in ESI mass spectra of the carboxylic acids

Carboxylic acid	Retention time (min)	m/z [relative intensity (%)]		
		[M-H] ⁻	[M+HCOOH-H] ⁻	[M+2HCOOH-H] ⁻
CA	6.3	191 (100)		
TA	6.5	149 (100)		
MA	6.8	103 (100)	149 (5.4)	
GlyA	8.4	75 (100)	121 (27)	167 (8.8)
SA	8.4	117 (100)	163 (2.9)	
LA	8.6	89 (100)	135 (12)	179 (2.5)
GluA	9.2	131 (100)	177 (9.9)	
2-HBA	9.5	103 (100)	149 (15)	195 (2.3)

LC conditions are same as Table 1. MS detection using ESI-MS interface in the negative mode; source temperature, 90 °C; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V; sample concentration, 1 mM each.

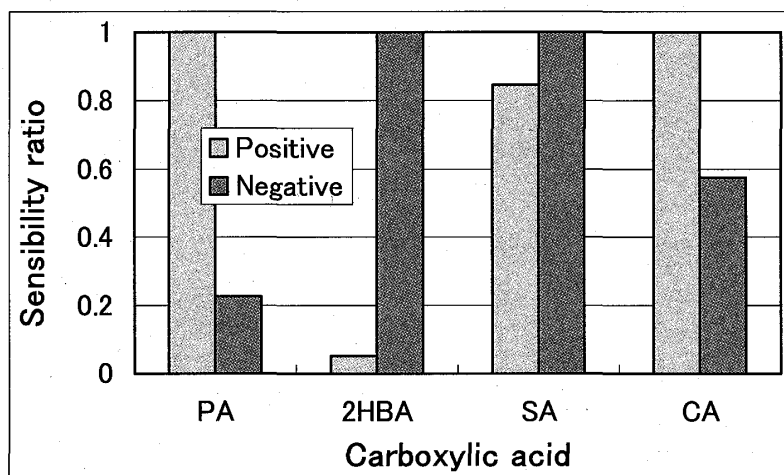


Fig. 3.

Ion current differences with positive ion and negative ion as the base peak of each carboxylic acid. MS conditions on ESI positive mode: source temperature, 70 °C; capillary voltage, 3.5 kV; cone voltage, 10 V; MS conditions on ESI negative mode: source temperature, 90 °C; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V. Sample concentration, 10 mM for PA and 1 mM for the others.

を、正及び負イオン化モードを用いて分析して得られたマスクロマトグラムを Fig. 4 に示した。クエン酸とコハク酸の保持時間が、それぞれ酒石酸及びグリコール酸のそれにほとんど近いが、マスクロマトグラム上区別して検出できることは明らかである。各成分とも良好な分離が得られ、マスクロマトグラム上十分検出可能であり15分以内で全成分が溶出した。

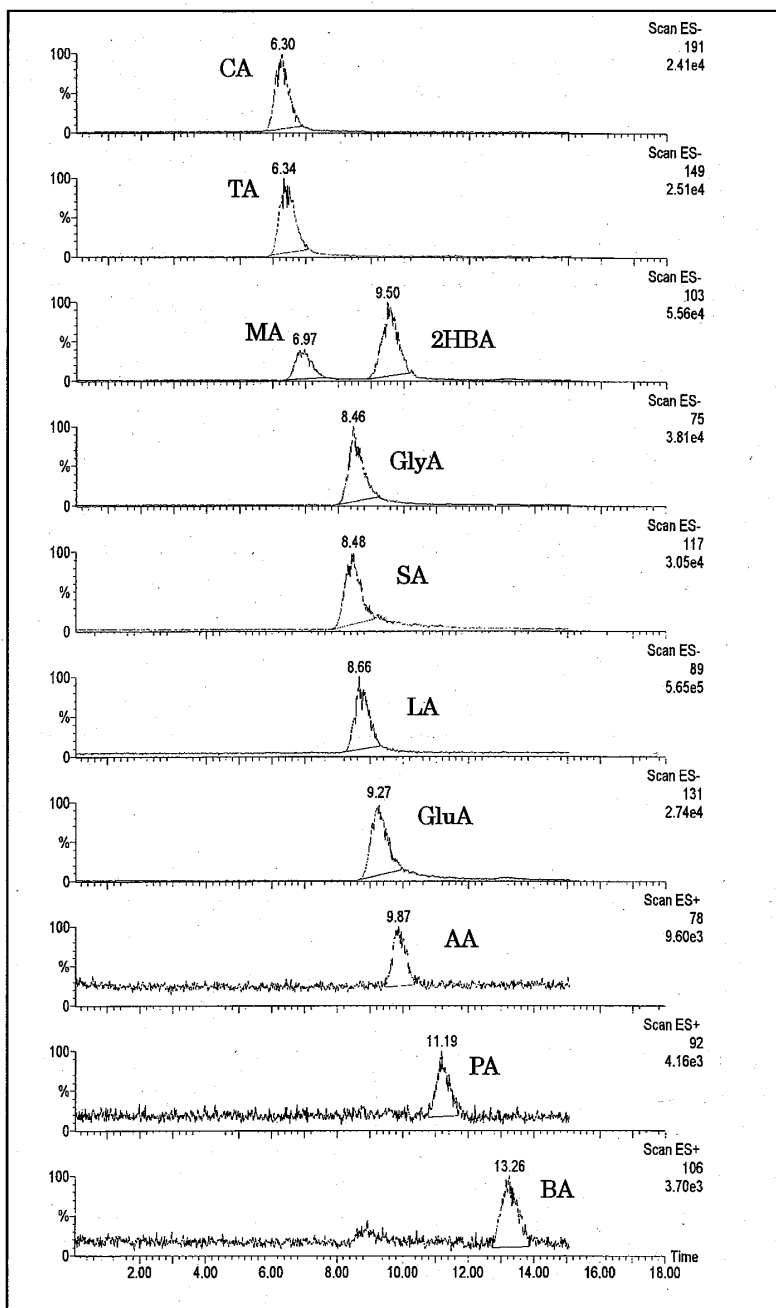


Fig. 4.

Mass chromatograms obtained by total ion current (TIC) profile for a mixture of the carboxylic acids. MS conditions for AA, PA and BA: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70 °C; capillary voltage, 3.5 kV; cone voltage, 10 V; MS conditions for the others: ESI-MS interface in the negative mode; source temperature, 90 °C; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V. Sample concentration, 10 mM for AA, PA and BA, and 1 mM for the others.

3・3 エレクトロスプレイイオン化パラメータの最適化

ESI イオン化におけるイオン化効率の最適化に関わる MS 条件のパラメータはいくつか存在するが、ここでは4種の有機酸を試料として用いて、イオン化効率に最も影響を与えるイオン源温度、キャピラリー電圧及びコーン電圧について検討を行った。イオン源温度の影響については、70~110°Cの範囲で10°C毎に温度を変化させた時のベースピークにおけるイオン強度を相対的に比較し、その結果を Fig. 5 にまとめた。図からわかるように、それぞれの有機酸の間で相関性は無く、最適なイオン源温度が有機酸毎にそれぞれ存在することがわかった。一度の分析中にイオン源温度を変化させることは不可能であるので、正イオン化モードでは70°Cに、負イオン化モードでは90°Cに設定することとした。

次にキャピラリー電圧の影響については、2.5-4.0 kV の範囲で0.5 kV 毎に電圧を変化させた時のベースピークにおけるイオン強度を相対的に比較し、その結果を Fig. 6 にまとめた。図からわかるように、それぞれの有機酸間で相関性は無く、最適なキャピラリー電圧がそれぞれ存在することがわかった。この場合も、一度の分析中にキャピラリー電圧を変化させることは不可能であるので、正イオン化モードでは3.5 kV に、負イオン化モードでは2.5 kV に設定することとした。

最後にコーン電圧の影響については、有機酸毎に段階的にコーン電圧を変化させ、5~35 V の範囲で5 V 毎に電圧を変化させた時のベースピークにおけるイオン強度を相対的に比較し、その結果を Fig. 7 にまとめた。図からわかるようにいずれも有機酸間で相関性は無く、最適なコーン電圧が有機酸毎にそれぞれ存在することがわかった。しかしながら正イオン化モードでは、水または酢酸由来の $[M + NH_4]^+$ イオンをベースイオンにしているため、コーン電圧の最適値が移動相に使う水により多少変動することが観察された。この場合も、一度の分析中にコーン電圧を変化させることは不可能であるので、正イオン化モードでは10 V に、負イオン化モードでは20 V に設定することとした。

以上の検討結果から、定量の際の MS 条件は、酢酸、プロピオン酸及び酪酸の検出には正イオン化モードにより、イオン源温度70°C、キャピラリー電圧3.5 kV 及びコーン電圧10 V とし、その他

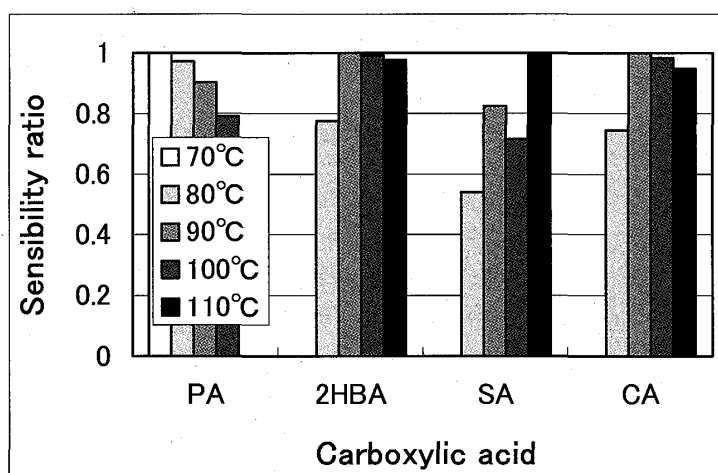


Fig. 5.

Effect of ion source temperature on ion currents of the base peak of each carboxylic acid. MS conditions for PA: ionization mode, ESI-positive; capillary voltage, 3.5 kV; cone voltage, 10 V; MS conditions for the others: ionization mode, ESI-negative; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V. Sample concentration, 10 mM for PA and 1 mM for the others.

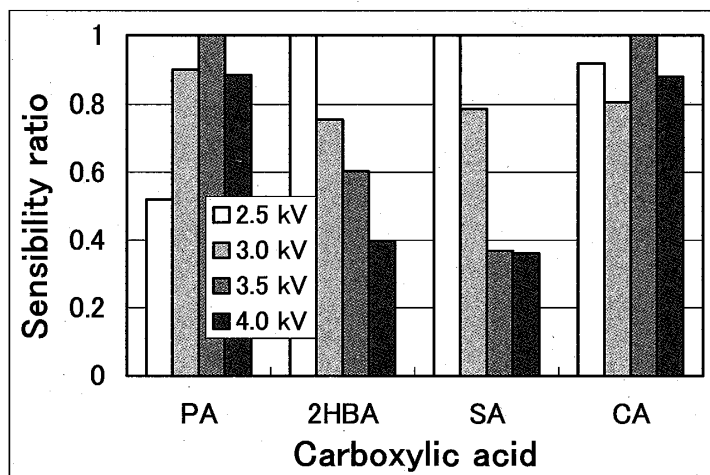


Fig. 6.

Effect of capillary voltage on ion currents of the base peak of each carboxylic acid. MS conditions for PA: ionization mode, ESI-positive; ion source temperature, 70 °C; cone voltage, 10 V; MS conditions for the others: ionization mode, ESI-negative; ion source temperature, 90 °C; cone voltage, 20 V. Sample concentration, 10 mM for PA and 1 mM for the others.

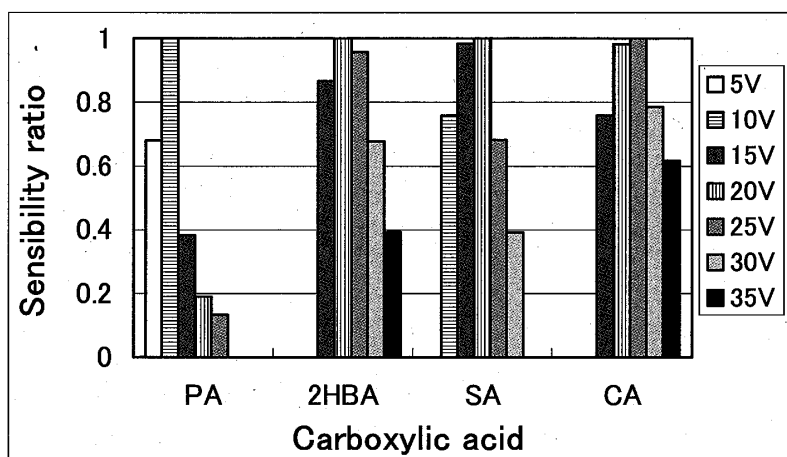


Fig. 7.

Effects of cone voltage on ion currents of the base peak of the carboxylic acids. MS conditions for PA : ionization mode, ESI-positive; ion source temperature, 70 °C; capillary voltage, 3.5 kV; MS conditions for the others: ionization mode, ESI-negative; ion source temperature, 90 °C; capillary voltage, 2.5 kV. Sample concentration, 10 mM for PA and 1 mM for the others.

の有機酸の検出には負イオン化モードにより、イオン源温度90°C、キャピラリー電圧2.5 kV及びコーン電圧20 Vとした。

3・4 有機酸の定量及び検出限界

以上の検討結果より、LC/MS条件を最適化した上で正及び負イオン化両モードを用いて、各有機酸のLC/MS分析における定量性及び検出限界を測定した。全ての有機酸について検量線を作成し

たところ、酢酸、プロピオン酸及び酪酸ではそれぞれ濃度として2~40 mMの間で、その他の有機酸では0.5~40 μ Mの間でいずれも直線性の高い検量線 (相関係数: 0.991~0.998) が得られた。

検出下限 (S/N=3) については、TIMモード及びSIMモード共に試料濃度でまとめた結果を Table 3 に示した。SIMモードでは、酢酸、プロピオン酸及び酪酸については[M + NH₄]⁺イオンを、その他の有機酸については[M - H]⁻イオンを選択した。SIMモードでの検出感度は高いが、TIMモードと比べてどの程度高感度検出できるのかについては有機酸の種類によって異なり、又バックグラウンドのノイズによって影響を受けるので一様ではない。酢酸やプロピオン酸などのモノカルボン酸に関しては、検出下限が0.02~1.6 mMのオーダーであり、必ずしも高感度検出とは言えない。一方負イオン化モードで計測した有機酸については、例えば2-ヒドロキシ酪酸やグルタル酸では90 nMの濃度での検出が可能であり、その他の有機酸についても数百nMのオーダーで検出が可能であった。この値は、UV検出法と比較しても10~100倍程度高い値であり、本法が低分子ヒドロキシカルボン酸やジカルボン酸の高感度分析法として有効であることが示された。なお本分析における保持時間及びピーク面積の再現性は、全有機酸でそれぞれ0.55~1.25%及び0.85~2.45% (n=10) であった。

3・5 移動相に添加する極性溶媒の検出感度に与える影響

移動相に極性有機溶媒を添加することで、各有機酸の保持時間、ピーク形状及び検出感度にどのような変化があるかを検討した。基本となる移動相0.1%ギ酸水溶液に対して、メタノールまたはアセトニトリルをそれぞれ5%及び10%の濃度になるように添加した移動相を作り、同様にプロピオン酸、2-ヒドロキシ-n-酪酸、コハク酸及びクエン酸の4種の有機酸について、それぞれの移動相に対してコーン電圧を最適化した後に保持時間及び検出感度を比較した。4種の有機酸全て、ベースピークとして生成する分子関連イオンに変化はないことがわかった。各移動相による保持時間の変化を Table 4 に示した。逆相分配クロマトグラフィーで溶出力の大きいアセトニトリルの添加が、メタノール以上を対象とした全ての有機酸の保持時間を早めることがわかった。またピーク形状の変化としては、有機溶媒の添加でコハク酸のみテイリングが解消されることがわかった。

一方検出感度の比較においては、上述の検出下限を測定したSIMモードにより移動相毎の検出感度を相対的に比較し、その結果を Fig. 8 に示した。この結果よりプロピオン酸及び2-ヒドロキシ酪酸については、極性有機溶媒の添加がむしろ感度低下を招くことが観察された。またコハク酸及びクエン酸についてはその挙動がまったく逆で、極性有機溶媒の添加が感度増加を招くことがわかり、コハク酸では10%のメタノール添加で約5倍、クエン酸については5%のメタノール添加で10倍程度の感度増加をもたらした。ジカルボン酸以上のカルボン酸で、検出感度の向上にメタノールの添加効果が観察されたことは興味深い。ピーク形状の改善が見られたのはコハク酸のみなので、そ

Table 3 Limits of detection of carboxylic acids

Carboxylic acid	LOD (M)	
	TIC	SIM
CA	3.35 μ	0.30 μ
TA	1.92 μ	0.16 μ
MA	1.50 μ	0.22 μ
GlyA	1.18 μ	0.32 μ
SA	1.75 μ	0.31 μ
LA	1.96 μ	0.44 μ
GluA	0.73 μ	0.09 μ
2-HBA	0.89 μ	0.09 μ
AA	2.47 m	1.62 m
PA	0.42 m	0.27 m
BA	0.19 m	0.02 m

LC/MS conditions were shown in Table 1 for AA, PA and BA and Table 2 for the others.

Table 4 Retention times of carboxylic acids at the different mobile phases

Carboxylic Acid	Retention time (min)				
	0.1%FA	MeOH/0.1%FA (5/95)	MeOH/0.1%FA (10/90)	AcCN/0.1%FA (5/95)	AcCN/0.1%FA (10/90)
CA	6.37	6.26	6.24	6.16	6.08
SA	8.59	8.26	8.10	7.99	7.59
2-HBA	9.50	9.34	9.10	9.06	8.70
PA	11.18	10.99	10.72	10.50	10.21

LC/MS conditions were shown in Table 1 for PA and Table 2 for the others except for mobile phases.

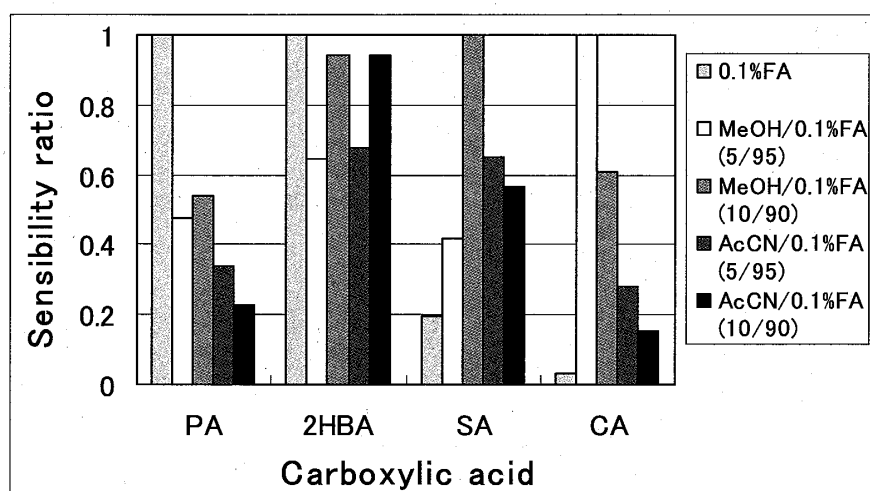


Fig. 8.

Effects of additives of polar organic solvents in a mobile phase, 0.1% (v/v) formic acid, on ion currents of the base peak of the carboxylic acids using SIM mode. MS conditions for PA: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70 °C; capillary voltage, 3.5 kV; cone voltage, 10 V; MS conditions for the others: ESI-MS interface in the negative mode; source temperature, 90 °C; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V for 2-HBA and SA and 25 V for CA. Sample concentration, 10 mM for PA and 1 mM for the others.

の理由だけではコハク酸の感度の上昇は説明できない。水のクラスター形成によるバックグラウンドの上昇をメタノールが軽減したとすれば、一様に感度が上昇しても良いと考えられるが、感度上昇の結果はジカルボン酸以上のカルボン酸の負イオン化モードの場合であり、メタノールがそれらの負イオン化生成に何らかの影響を与えたことは明らかである。対象とした有機酸の種類が必ずしも多くはないので、これだけの結果からは感度上昇の理由を定量的に説明するのは難しいが、今後更に有機酸の対象を増やして、詳細な検討をしていきたい。

以上本研究により、イオン排除モードのセミマイクロカラムの開発によって、低分子有機酸に対するエレクトロスプレーイオン化 LC/MS 分析の適用が可能となり、感度及び定量性の面から実用上有効であることが示唆された。バックグラウンドノイズの影響にも注意を払わなければならないが、エレクトロスプレーイオン化法によって低分子の有機酸でも十分に分子関連イオンをベースイオン

として検出することが可能であり、定量性のある分析法として技術的に貢献できるものと思われる。しかしながら本研究は、標準有機酸を用いるモデル系で行ったものであり、実際の試料分析に適用するためには、分離条件などの更なる検討を必要とする。今後更に広範囲の有機酸に対する本法の条件検討を行い、有機酸の定量法として本法の有効性を追究していきたいと考えている。

文 献

- 1) 三宅隆之, 竹田一彦, 藤原祺多夫, 佐久川弘: 日本化学会誌, 357 (2000).
- 2) 田中茂, 安江憲介, 橋本芳一: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), 39, 13 (1990).
- 3) 山田悦, 田口秀之, 佐藤昌憲: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), 43, 995 (1994).
- 4) 戸塚新一, 松田恒, 佐藤孝義, 皆川憲夫: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), 45, 927 (1996).
- 5) 柿沼宏明, 山本重則, 西牟田敏之, 山下博徳: 質量分析, 34, 131 (1986).
- 6) 藤村一良, 土屋正彦: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), 37, 549 (1988).
- 7) S. A. Baker, J. A. Monti, S. T. Christain, F. Benington. R. D. Morin: *Anal. Biochem.*, 107, 116 (1980).
- 8) J. B. F. Lloyd: *J. Chromatogr.*, 189, 359 (1980).
- 9) H. Miwa, C. Hiyama, M. Yamamoto: *J. Chromatogr.*, 321, 165 (1985).
- 10) 齋藤尋輝, 蒲生啓司: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), 52, 823 (2003).
- 11) S.K.Johnson, L.L.Houk, J.Feng, D.C.Johnson, R.S.Houk: *Anal. Chim. Acta*, 341, 205 (1997).
- 12) M.I.H.Helaleh, K.Tanaka, H.Taoda, W.Hu, K.Hasebe, P.R.Haddad: *J. Chromatogr. A*, 956, 201 (2002).
- 13) K.Gamoh, H.Saitoh, H.Wada, K.Hishida: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 685 (2003).

要 旨

本研究では、低分子有機酸の高感度分析を目的として、従来から使われてきたイオン排除モードに基づくそれらの分離に注目し、質量分析による検出を可能にすべくスルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂 (H) 型を充填したセミマイクロカラム (ULTRON PS-80H) を新たに開発した。ギ酸または酢酸を移動相として低分子有機酸11種を15分以内に分離した。エレクトロスプレイイオン化法における分析条件を検討した結果、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からは正イオン化モードにより $[M + NH_4]^+$ イオンを、グリコール酸、乳酸、2-ヒドロキシ酪酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸及びクエン酸からは負イオン化モードにより $[M - H]^-$ イオンを最適イオン種として検出した。イオン化に影響する種々のパラメータ、すなわちイオン源温度、キャピラリー電圧及びコーン電圧を検討した結果、酢酸、プロピオン酸及び酪酸ではそれぞれ2~40 mM の間で、その他の有機酸では0.5~40 μ M の間でいずれも直線性の高い検量線 (相関係数: 0.991~0.998) が得られた。選択イオンモニタリング (SIM) モードによる検出下限は、2-ヒドロキシ酪酸やグルタル酸では90nM (S/N=3) の濃度であり、その他の有機酸についても数百 nM のオーダーで検出が可能であった。保持時間及びピーク面積の再現性は、それぞれ0.55~1.25%及び0.85~2.45% (n=10) であった。また上記移動相に添加する極性溶媒の検出感度に与える影響を検討した結果、コハク酸については5% (v/v) の、クエン酸については10% (v/v) のメタノールの添加により、検出感度が格段に向上することがわかった。このカラムの開発により、誘導体化を行わない低分子有機酸の液体クロマトグ

ラフィー/質量分析 (LC/MS) 法による分析が可能になり, 従来の吸光度検出感度を上回る分析法として技術的に貢献できるものと思われる.

平成18年 (2006) 11月20日受理

平成19年 (2007) 1月11日採択