

【ノート】

【令和7年度 先端技術等調査研究事業】

UPLC-MSの新たな測定メニューの充実

星野 友花、佐藤 信行*

食品バイオ技術部(*現 企画・事業推進部)

当センター保有の超高速液体クロマトグラフ質量分析システム(UPLC-MS)では、これまで主にアミノ酸およびポリフェノールの測定を行ってきたが、他の食品成分に対する測定ニーズも増加している。本調査では果実、野菜、発酵食品等に多く含まれ、食品の風味形成や保存性に寄与する成分である有機酸に着目し、UPLC-MSでの分析条件を検討した。既報を参考に、Phenyl-hexylカラム、水およびアセトニトリルにギ酸を添加した移動相を用い、質量分析装置での検出条件を最適化することにより、乳酸、リンゴ酸、クエン酸、グリコール酸、コハク酸、フマル酸、ピルビン酸、フェルラ酸、酢酸の分離、および定量性を確認した。

キーワード：成分分析、超高速液体クロマトグラフ質量分析システム(UPLC-MS)、有機酸、逆相カラム(Phenyl-hexylカラム)

1 緒言

食品に存在する有機酸は、天然由来のほかには酸味料あるいはpH調整剤として添加されたものなどがある。これらの有機酸は、食品の風味や鮮度、保存性に大きく関与している¹⁾。

当センターでは超高速液体クロマトグラフ質量分析システム(UPLC-MS)を保有しているが、これまでは主にアミノ酸およびポリフェノールの測定を行ってきた。一方で有機酸をはじめとしたその他の食品成分に対する測定ニーズも増加している。

そこで、本調査ではUPLC-MSを用いた有機酸の分析手法を検討し、測定メニューの拡充に向けた分析条件を構築することを目的とした。

従来はWaters社のアプリケーションノート²⁾(以下、従来法)を参考に分析を行っていたが、分離能の向上およびより実用的な分析条件の確立を目指して、本調査では、新たに公開されたアプリケーション³⁾(以下、新手法)を参考に検討を行った。具体的には、有機酸の分離状況を検証するとともに、測定例に記載のない有機酸についても分離の可否を確認した。さらに、各有機酸の定量性についても評価を行った。

2 調査内容及び方法

2.1 使用機器

Waters社製ACQUITY UPLC H-Class PLUSシステム

およびSQ DETECTOR 2を用いて分析を行った。装置の制御およびデータ解析には、同社製ソフトウェアMassLynxを使用し、測定ならびに保持時間およびピーク面積の解析を行った。

2.2 有機酸類の分析

1)測定方法

分離カラムにはWaters社製ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl(内径2.1 mm×長さ100 mm、粒径1.7 μm)を用いて、カラム温度は50℃に設定した。移動相は、A液:0.1%ギ酸水溶液(LC-MSグレード)、B液:0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(LC-MSグレード)を用いてグラジエント分析を行い(表1)、流速は0.4 mL/分、試料注入量は1 μLとした。質量分析の条件は、イオン化法はESI法、キャピラリー電圧2.2 kV、コーン電圧30 V、ソース温度150℃、デソルベーション温度500℃、コーンガスフロー50 L/h、デソルベーションガスフロー1000 L/hとした。

2) 主な有機酸の分離状況の確認

新手法に測定例として記載のあった乳酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸に加え、過去に測定ニーズのあった酢酸、グリコール酸、ピルビン酸、フェルラ酸について、分離状況の確認を行った。フマル酸、フェルラ酸は95%エタノールに溶解し、残りは超純水に溶解して1%(w/v)溶液を調製した。これらを等量混合後、超純水で希釈し、1000、500、100、50、10 ppmの標準液を調

製した。分析は乳酸、リンゴ酸、クエン酸混合液と酢酸、グリコール酸、コハク酸、ピルビン酸、フマル酸、フェルラ酸混合液で行った。

各有機酸の分離状況は、BPIクロマトグラム(各保持時間において最も強度の大きい m/z のイオン強度をプロットしたクロマトグラム)により確認した。

表 1 グラジエント条件

時間 (分)	流速 (mL/min)	A液%	B液%
0	0.4	100	0
0.5	0.4	100	0
3.5	0.4	75	25
3.6	0.4	5	95
4.6	0.4	5	95
4.7	0.4	1	99
7	0.4	1	99
7.1	0.4	100	0
11.0	0.4	100	0

3) 定量性の確認

コハク酸、グリコール酸、フマル酸、ピルビン酸、フェルラ酸の測定結果に基づき、10 から 1000 ppm の範囲における検量線の直線性(定量性)を評価した。検量線は、各有機酸の SIR クロマトグラム(特定の単一 m/z 値($m/z=[M-H]$)について抽出したクロマトグラム)におけるピーク面積と濃度の関係について、一次近似式、二次近似式、累乗近似式を最小二乗法により算出して作成した。また、各近似式について、決定係数(R^2)を比較した。

3 結果と考察

3.1 従来法と新手法の比較

従来法では移動相として50 mMギ酸アンモニウム0.9 % 含有ギ酸水溶液、0.9 %ギ酸アセトニトリル溶液、0.9 %ギ酸水溶液の3種類を使用する。このうち、ギ酸アンモニウムを含む移動相は分析中に塩が析出する可能性があり、カラム閉塞の懸念がある。一方、新手法では移動相は2種類で構成されており、塩を使用しないことから、より実用性が高く、安定した分析が可能であることが分かった。

3.2 主な有機酸の分離状況の確認

各混合液のBPIクロマトグラム(図1)および有機酸の

保持時間(表2)を示す。酢酸以外の有機酸について、Negativeモードでの分離を確認した。一方で、詳細な定量についてはSIRクロマトグラムを得るなどの工夫が必要であると考えられた。

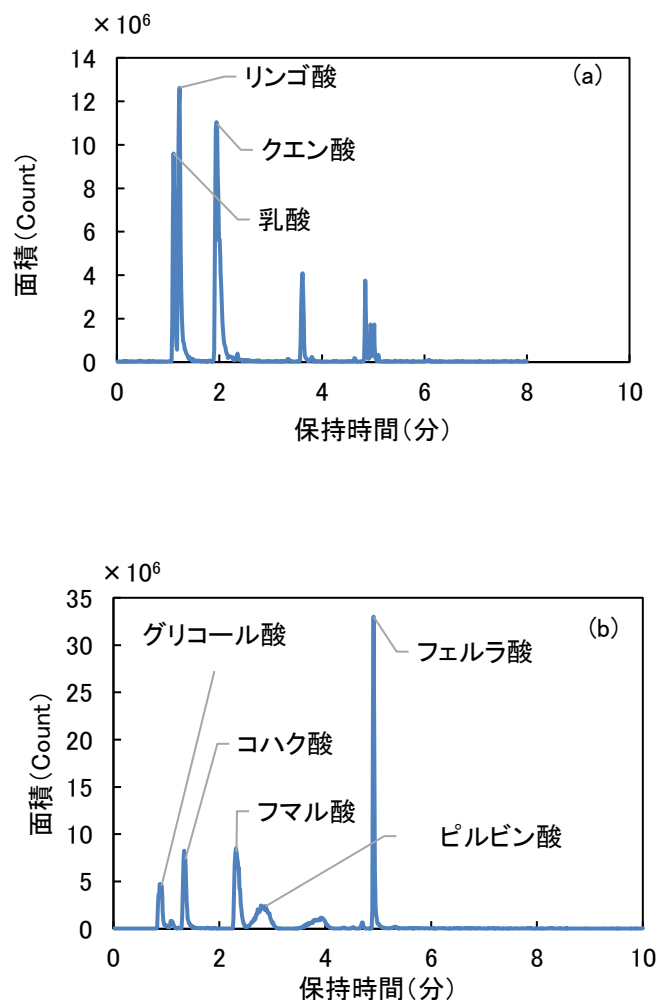


図1 標準試料のBPIクロマトグラム((a): 乳酸、リンゴ酸、クエン酸、(b): グリコール酸、コハク酸、ピルビン酸、フマル酸、フェルラ酸)

表 2 各有機酸の保持時間

物質名	分子量	保持時間 (分)
グリコール酸	76.05	0.87
乳酸	90.08	1.11
リンゴ酸	134.09	1.22
コハク酸	118.09	1.33
クエン酸	192.12	1.94
フマル酸	116.07	2.31
ピルビン酸	88.06	2.78
フェルラ酸	194.19	4.91

また、Negative モードで検出できなかった酢酸標準試料について、Positive モードで検出を行ったところ、保持時間約 1 分付近に濃度に応じて面積が変化するピークが確認された(図 2)。この結果から、酢酸については Positive モードでの検出が適していることが示された。

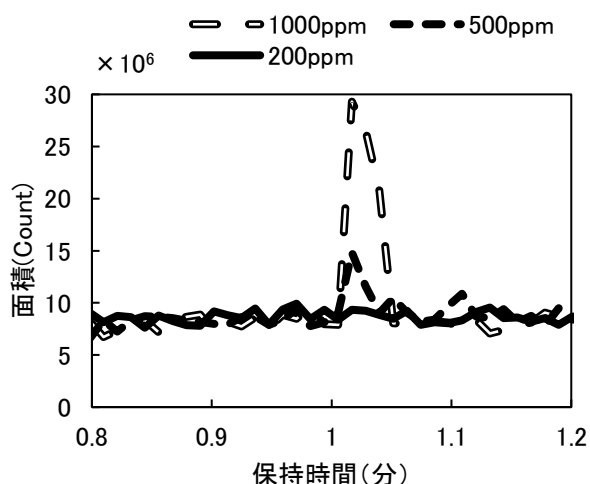


図 2 酢酸の BPI クロマトグラム(200~1000ppm)

3.3 定量性の確認

作成した検量線について、各有機酸の決定係数を表 3 に示す。コハク酸、グリコール酸、フマル酸では累乗近似式において最も高い決定係数が得られた。一方、ピルビン酸、フェルラ酸では二次近似式において最も高い決定係数が得られた。例としてコハク酸について、一次近似式、二次近似式、累乗近似式により作成した検量線を示す(図3~5)。これらの結果から、一次近似式と比較して、累乗近似式および二次近似式で高い定量性が得られる可能性が示唆された。

表 3 検量線の決定係数

	決定係数(R ²)		
	一次近似式	二次近似式	累乗近似式
コハク酸	0.9644	0.9927	0.999
グリコール酸	0.9896	0.9953	0.9964
フマル酸	0.9768	0.9966	0.9969
ピルビン酸	0.9937	0.9998	0.9952
フェルラ酸	0.9522	0.995	0.99

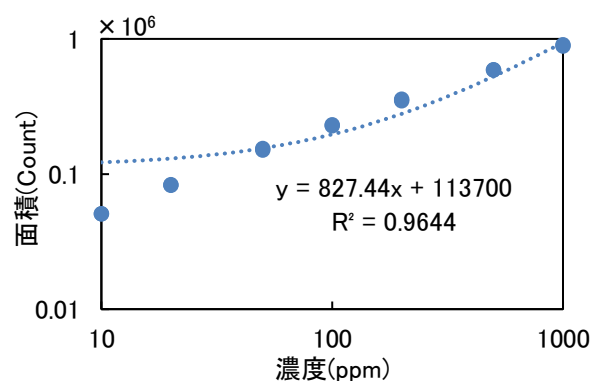


図 3 一次近似式による検量線(コハク酸)

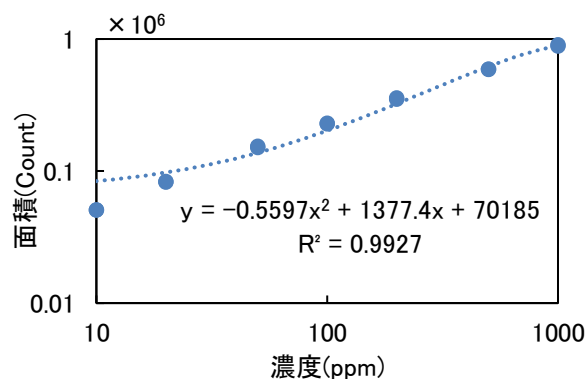


図 4 二次近似式による検量線(コハク酸)

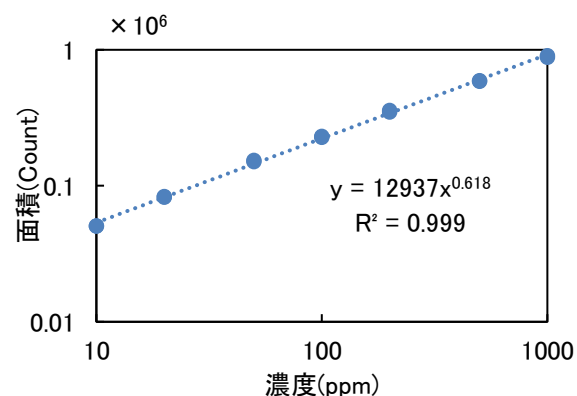


図 5 累乗近似式による検量線(コハク酸)

4 まとめ

従来法ではギ酸アンモニウムを含む移動相を使用するため、分析中に塩が析出する可能性があり、カラム閉塞の懸念がある一方、新手法では移動相は2種類で構成されており、塩を使用しないことから、より実用性が高く、安定した分析が可能であることが分かった。

また、乳酸、リンゴ酸、コハク酸、クエン酸、フマル酸に加え、測定例に記載のないグリコール酸、ピルビン酸、フェルラ酸についても、Negativeモードで検出可能であることを確認した。一方、酢酸についてはPositiveモードでの検出が適していることが示された。

定量性については、累乗近似式および二次近似式で検量線を作成することにより、高い定量性が得られる可能性が示唆された。

参考文献、引用URL

- 1) 天川映子、大西和夫、西島基弘、坂井千三, 日本食品衛生学雑誌, 1988, 29(4), p.267-272.
- 2) Waters アプリケーションノート,720006938-JA (<https://www.waters.com>(参照2026-05-20))
- 3) Waters アプリケーションノート,720007289-JA (<https://www.waters.com>(参照2026-05-20))