

LC/MS における高極性化合物測定の事例紹介及び条件検討

小川直也

分析・物質技術支援室 組成分析・構造解析技術グループ

概要

LC-MS において最も一般的に用いられる分離モードは、固定相をオクタデシル基で修飾したシリカゲルを充填した ODS カラムを用いる逆相モードである。逆相モードでは、疎水性相互作用に基づいて溶質を保持し、親水性の高い物質から疎水性の高い物質の順に溶出させることができる。

しかし、ODS カラムでは親水性の高い物質の保持が弱く、アミノ酸のような高極性化合物を誘導体化せずに測定することは困難である。

発表者は農学部機器分析室に勤務しており、アミノ酸、有機酸、糖などの高極性生体関連化合物の分析依頼を受ける機会が多い。そのため、疎水性・イオン交換マルチモードカラムや非誘導体化アミノ酸分析用カラムなど、種々の親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）カラムを用いて分析に対応している。

本発表では、HILIC カラムを用いた高極性化合物の測定について、ODS カラムとの比較を行うとともに、実際の測定事例および条件検討の結果を報告する。

1 はじめに

質量分析（Mass Spectrometry: MS）は、分子の質量（ m/z ）を測定することで、試料中成分の定性および定量を可能とする分析手法である。一般的な装置構成は、試料導入部、イオン化部、質量分離部、検出部から成り、液体クロマトグラフィー（LC）やガスクロマトグラフィー（GC）と組み合わせることで、複雑な混合物の高精度分析が可能となる（図1）。

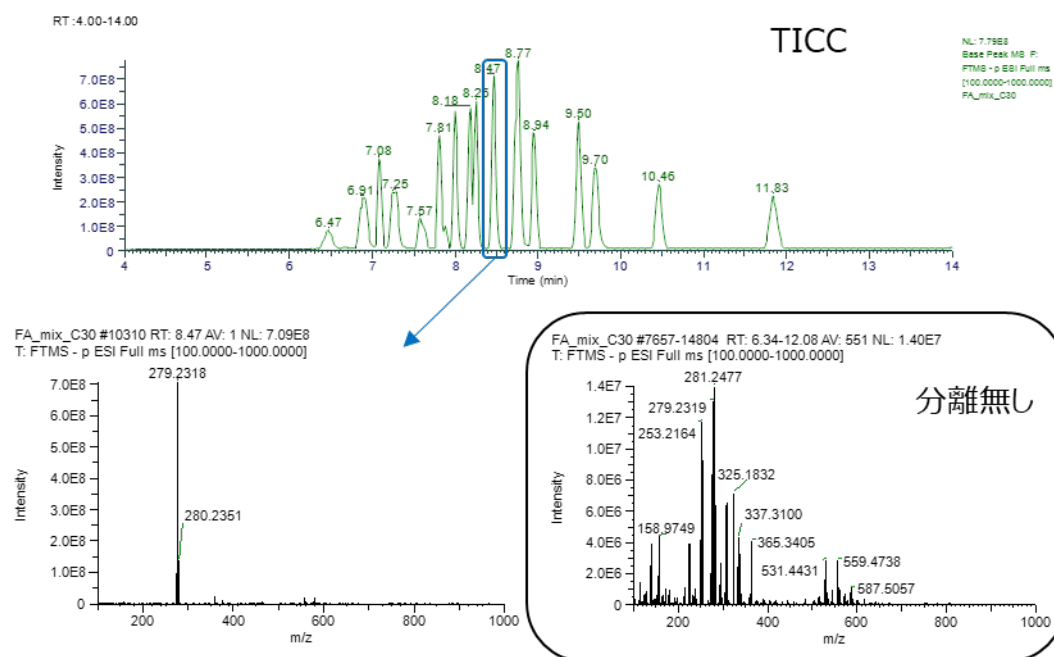


図1 LC使用によるマスペクトルへの影響

LC/MS は、LC による成分分離と MS による質量分析を組み合わせた手法であり、幅広い化合物の分析に用いられている。しかしながら、低分子かつ高極性の化合物においては、従来の逆相クロマトグラフィーでは十分な分離が得られないという課題がある。

2 高極性化合物の分離における課題と対策

LC/MS において一般的に使用される逆相カラム（C18 カラム）は、疎水性相互作用に基づいて分離を行うため、親水性の高い化合物は保持が弱く、十分な分離が困難である。

この課題に対する主な対策として、以下の2手法が挙げられる。

(1) 誘導体化

親水性化合物を誘導体化することで疎水性を付与し、逆相カラムでの分離を可能とする手法である。高感度での検出が可能である一方、前処理工程が増加し、誘導体化効率評価のために内部標準が必要となる。

(2) 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）

HILIC は親水性化合物を強く保持できるため、高極性化合物の分離に有効である。誘導体化を必要としない利点があるが、感度低下やカラム平衡化に時間を要する場合がある。

3 事例紹介および条件検討

本研究では、アミノ酸、有機酸、糖といった高極性化合物を対象に、複数のカラムおよび分析条件を比較検討した。

(1) アミノ酸分析

20 種類のアミノ酸混合物を用い、逆相カラムおよび HILIC 系カラムで比較した。その結果、逆相カラムでは分離が不十分であったのに対し、HILIC カラムでは各成分の分離が大きく改善された。特に、アミノ酸分析用カラム（Intrada Amino Acid）を使用した条件が最も良好な結果が得られた^[1]（図2）。

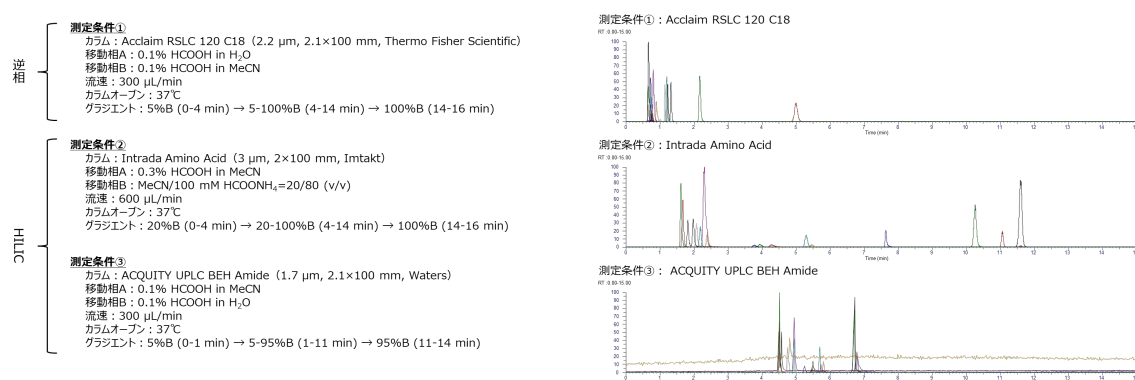


図2 アミノ酸分析比較

(2) 有機酸分析

有機酸混合物についても同様の検討を行った結果、逆相条件ではピークの重なりが見られたが、HILIC 系カラム（有機酸分析用カラム：Intrada Organic Acid）の使用により分離性能の向上が確認された^[2]（図3）。

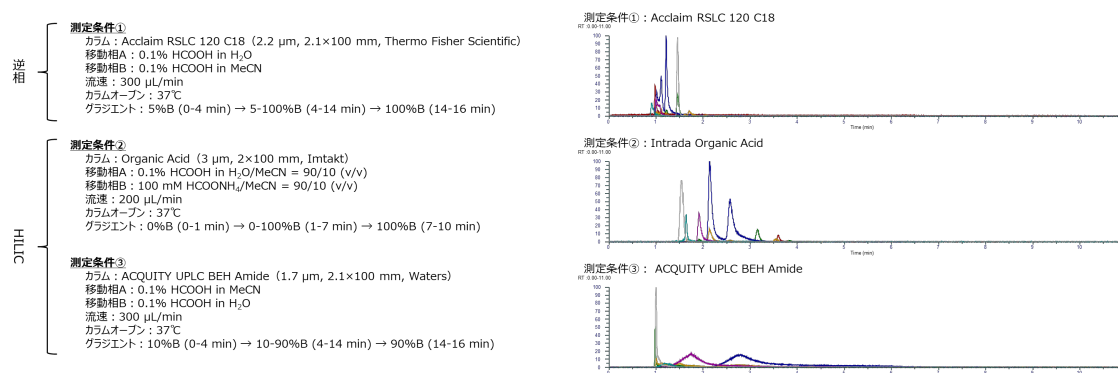


図3 有機酸分析比較

(3) 糖分析

単糖、二糖、三糖を含む混合試料においても、逆相カラムでは保持が弱く分離が困難であったが、Amide カラム（ACQUITY UPLC BEH Amide）を使用した HILIC 条件下では明確な分離が得られた（図4）。

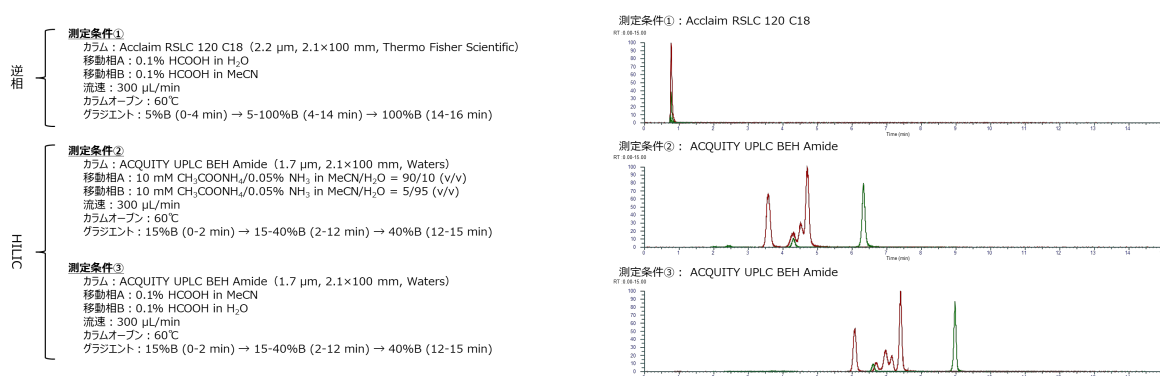


図4 糖分析比較

4 実試料への応用

実試料として市販の緑茶およびほうじ茶を用い、アミノ酸分析を実施した。試料は抽出・遠心・濾過処理を行った後、Intrada Amino Acid カラムを用いて測定した。その結果、実試料においても良好な分離が得られ、本手法の有用性が確認された（図5）。

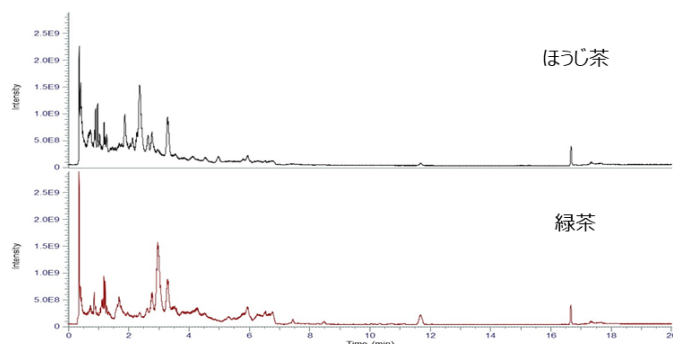


図5 市販品の緑茶のアミノ酸分析結果

5 まとめ

本研究により、高極性化合物の LC/MS 分析においては、対象化合物に応じた適切なカラム選択が極めて重要であることが再確認された。特に、HILIC カラムは高極性化合物の分離に有効であることが示された。

また、十分な分離を得るためには、既存条件をそのまま適用するのではなく、移動相組成やグラジエント条件を適宜調整する必要があることが明らかとなった。

6 謝辞

本研究は、令和 6 年度 名古屋大学全学技術センター自発的技術研鑽助成プログラム（採択番号 2024-02）の支援を受けて実施した。

参考文献

- [1] Imtakt Technical Information No. TI770E, <http://www.imtakt.com/TecInfo/TI770E.pdf>
- [2] Imtakt Technical Information No. TIA07E, [http://www.imtakt.com/TecInfo/ No.TIA07E.pdf](http://www.imtakt.com/TecInfo/No.TIA07E.pdf)