

報 文

低分子有機酸の 2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体の
液体クロマトグラフィー/質量分析法齋藤 尋輝¹, 蒲生 啓司^{®1}Liquid chromatography/mass spectrometric analysis of
2-nitrophenylhydrazide derivatives of low-molecular organic acidsHiroki SAITOH¹ and Keiji GAMOH¹¹ Faculty of Education, Kochi University, 2-5-1, Akebono-cho, Kochi-shi, Kochi 780-8520

(Received 14 April 2003, Accepted 1 August 2003)

In chromatographic analysis, a suitable derivatization of the functional groups has sometimes been used to enhance the sensitivity and selectivity for detection. Transforming low molecular organic acids to the corresponding 2-nitrophenylhydrazide derivatives has been more extensively used as a suitable derivatization method for liquid chromatographic UV-VIS detection. In the present study, liquid chromatography/mass spectrometric (LC-MS) detection with electro spray ionization was successfully applied to the analysis of low-molecular organic acids, glycolic, acetic, lactic, 2-hydroxy-*n*-butyric, propionic and *n*-butyric acid as their 2-nitrophenylhydrazide derivatives. Of a range of analytical conditions that were tested, the optimum results were obtained by using reversed-phase liquid chromatography and a mixture of methanol/water or methanol/ammonium formate. The positive- and negative-ion spectra of 2-nitrophenylhydrazides of the organic acids showed molecular-related ions, $[M + H]^+$ and $[M - H]^-$, whose ions were the most abundant, respectively. The effects of the chromatographic and ionization parameters, mobile phase, concentration of ammonium formate, pH and cone voltage on the sensitivity and linearity were examined. Linear plots of the peak area versus the concentration were obtained for MS detection over the range of 0.05 ~ 10 μ M for propionic acid and 0.1 ~ 10 μ M for lactic acid. Full-scan mass spectra were readily obtained from 34 nM of *n*-butyric acid derivative, while a limit of detection of 1.4 nM (signal-to-noise ratio 3) was attained in the selected-ion monitoring mode. These results showed that 2-nitrophenylhydrazide of low molecular organic acids contributes to the enhancement of the LC-MS detection compared with their UV-VIS detection.

Keywords : LC-MS; 2-nitrophenylhydrazide derivative; low-molecular organic acid; electrospray.

1 緒 言

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¹⁾。また近年では、酸性降下物などの環境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った^{2)~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

ンで現れることが分かっており、有機酸が体内のコレステロール値を下げる働きやがん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 HPLC⁷⁾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。三輪らは、有機酸を 2-ニ

¹ 高知大学教育学部: 780-8520 高知県高知市曙町 2-5-1

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、酸ヒドラジドとして紫外・可視領域において検出する HPLC を報告している⁹⁾。

一方、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) 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。有機酸を酸ヒドラジドとして LC/MS を行うことは、誘導体化反応の高い官能基選択性に加えて、マススペクトル上誘導体に特異的な質量数が観察されると考えられることから、有機酸の同定をより確実なものにする。HPLC によって分析されてきた多くの物質について、LC/MS の検討が十分に行われておらず、有機酸の誘導体の分析についても LC/MS を用いた例はほとんど見られない。この方法が実用的なものとなるためには、検出感度の問題など基礎的データの集積が必要である。

本研究では、有機酸に対する微量分析法として、酸ヒドラジドの形成に基づく LC/MS の有用性を検討する目的で、各々の有機酸の計測における分析条件の最適化を行い、定量下限を求めた。

2 実 験

2.1 試 薬

本研究で誘導体化の対象とした有機酸は、モノカルボン酸である酢酸 (和光純薬製)、プロピオン酸 (SIGMA 製)、*n*-酪酸 (SIGMA 製) 及びヒドロキシカルボン酸であるグリコール酸 (東京化成製)、L-(+)-乳酸 (SIGMA 製)、DL-2-ヒドロキシ-*n*-酪酸 (和光純薬製) の 6 種類であり、いずれも市販のナトリウム塩を用いた。これらの有機酸はすべて 100 mM の水溶液として調製後、適宜希釈して使用した。誘導体化試薬である 2-NPH·HCl (東京化成製) 及び 1-EDC·HCl (SIGMA 製) は、エタノールで溶解し、それぞれ 20 mM, 250 mM に調製した。ピリジン (和光純薬製) は 3% (v/v) のエタノール溶液として調製し、水酸化カリウム (和光純薬製) は 15% (w/v) のメタノール水溶液 (80 : 20) として調製した。移動相溶媒等、他の試薬はすべ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、カラムとして資生堂製 Capcell Pak C18 UG120 (1.5 mm i.d. × 250 mm) を用いた。カラム恒温槽として NANOSPACE SI-1 2004 (資生堂製) を用い、カラム温度を 40℃ に設定した。検出器には、UV-VIS 検出器 (UV-970, セル容量:

2.6 µl, 光路長: 5 mm, 日本分光製) 及び質量分析計 (VG Quattro II, Micromass 製) を接続して用いた。移動相として、LC/UV (検出波長 230 nm 又は 400 nm) 分析においては、メタノール/20 mM リン酸二水素カリウム水溶液 (pH 4.5) (50 : 50) を用い、LC/MS においては、メタノール/20 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (50 : 50) を流量 0.1 ml/min で用いた。MS 部のイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用い、ESI 法におけるイオン源温度を 100℃, キャピラリー電圧を 3.2 kV とし、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 100~500 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。

2.3 誘導体化反応

誘導体化反応は文献⁹⁾に従って、ピリジン溶液 200 µl に 1-EDC·HCl 溶液 200 µl を加えた溶液に対して、1 mM に調製した有機酸標準試料溶液 100 µl 及び 2-NPH·HCl 溶液 200 µl を加えた。60℃ で 20 分間加熱した後、水酸化カリウム溶液 100 µl を加え、60℃ で 20 分間加熱した。この反応液を室温まで冷却した後、リン酸緩衝溶液 (pH 1.5) 2.4 ml 及びエーテル 5 ml を加え、3000 r.p.m. で 5 分間遠心分離を行った上で、上層を回収し、窒素気流下でエーテルを蒸発させた後、残留物を 100 µl のメタノールで再溶解し、適宜希釈して 5 µl を LC/UV 又は LC/MS に導入した。

3 結果及び考察

3.1 有機酸ヒドラジドのマススペクトル

本法において誘導体化の対象とした有機酸は、モノカルボン酸及びヒドロキシカルボン酸であり、ヒドロキシカルボン酸のヒドラジド誘導体の場合には、水酸基をそのまま残していることから、負イオンモードの検出が有利であると考えられる。ここでは、対象となる有機酸ヒドラジドがどのようなイオン形態で検出できるかという基礎的な情報を収集するために、移動相としてメタノール/水及びメタノール/ギ酸アンモニウムを用いた場合について、正及び負イオン化モードによるマススペクトルの記録を行った。更に、各条件下における検出感度を比較することで、有機酸ヒドラジドの LC/MS 測定における最も適した移動相の種類及びイオン化モードを決定することとした。

6 種類の有機酸ヒドラジドに対して、移動相としてメタノール/水を用いて測定した結果、すべてのヒドラジドについて正及び負イオン化モードによる分子量関連イオンの検出が可能であることが分かった。この結果を Table 1 及

Table 1 Relative intensities of the positive-ions in ESI mass spectra of 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids

Carboxylic acid	Retention time/ min	<i>m/z</i> (relative intensity, %)		
		[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	[M + K] ⁺
Acetic acid	5.3	196 (35)	218 (100)	234 (41)
Propionic acid	5.9	210 (73)	232 (100)	248 (45)
<i>n</i> -Butyric acid	8.2	224 (77)	246 (100)	262 (46)
Glycolic acid	4.9	212 (23)	234 (100)	250 (45)
(L)-(+)-Lactic acid	5.6	226 (52)	248 (100)	264 (49)
DL-2-Hydroxy- <i>n</i> -butyric acid	6.7	240 (100)	262 (95)	278 (49)

LC/MS conditions: mobile phase, methanol/water (50 : 50); ionization mode, ESI-positive; cone voltage, 25 V

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

Carboxylic acid	Retention time/ min	<i>m/z</i> (relative intensity, %)			
		[M - H] ⁻	[M + Cl] ⁻	[M + EtOH - H] ⁻	[M + 90 - H] ⁻
Acetic acid	4.9	194 (100)	230 (4.2)	240 (8.6)	284 (2.9)
Propionic acid	5.5	208 (100)	244 (4.8)	254 (6.7)	298 (2.5)
<i>n</i> -Butyric acid	6.9	222 (100)	258 (5.4)	268 (4.8)	312 (2.1)
Glycolic acid	4.5	210 (100)	246 (2.4)	256 (1.1)	300 (4.2)
(L)-(+)-Lactic acid	4.8	224 (100)	260 (1.1)	270 (0.5)	314 (2.4)
DL-2-Hydroxy- <i>n</i> -butyric acid	5.5	238 (100)	274 (2.8)	284 (0.5)	328 (1.9)

LC/MS conditions: mobile phase, methanol/water (50 : 50); ionization mode, ESI-negative; cone voltage, 25 V

Table 3 Relative intensities of the positive-ions in ESI mass spectra of 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids

Carboxylic acid	Retention time/ min	<i>m/z</i> (relative intensity, %)		
		[M + H] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	[M + K] ⁺
Acetic acid	5.4	196 (100)	213 (22)	234 (28)
Propionic acid	6.1	210 (100)	227 (40)	248 (15)
<i>n</i> -Butyric acid	6.7	224 (100)	241 (25)	262 (10)
Glycolic acid	5.0	212 (100)	229 (40)	250 (19)
(L)-(+)-Lactic acid	5.3	226 (100)	243 (22)	264 (17)
DL-2-Hydroxy- <i>n</i> -butyric acid	5.4	240 (100)	257 (11)	278 (2)

LC/MS conditions: mobile phase, methanol/20 mM ammonium formate (50 : 50); ionization mode, ESI-positive; cone voltage, 20 V

び Table 2 にまとめたが, 正イオン化モードにおいては, すべての有機酸について分子量関連イオンとして主に [M + Na]⁺ のイオンが強い強度で得られ, 併せて [M + H]⁺ や [M + K]⁺ のイオンが観察された. ここで検出された [M + Na]⁺ イオンは, 移動相として用いた水中の Na⁺ の影響を受けていると考えられ, 移動相を作り替えて繰り返し測定を行った結果, スペクトルの再現性に乏しいことが分かった. 一方, 負イオン化モードにおいては, 6 種すべてのヒドラジドについて [M - H]⁻ が強い強度で得られ, 他に [M + Cl]⁻ や [M + EtOH - H]⁻ がわずかに観察される程度の非常にシンプルなマススペクトルが得られた.

次に, 移動相をメタノール/ギ酸アンモニウムとして LC/MS で測定したところ, 正及び負どちらのイオン化モードにおいてもすべての分子量関連イオンが検出されることが分かった. その結果を Table 3 及び Table 4 にまとめ

た. すなわち, 正イオン化モードにおいては, すべての有機酸においてプロトン付加イオン [M + H]⁺ が強い強度で観察され, 他に [M + NH₄]⁺ や [M + K]⁺ のイオンが観察された. ここで得られた正イオン化モードのマススペクトルは, 移動相としてメタノール/水を用いた場合に比べて再現性が良いことが分かった. また Table 4 から明らかなように, 負イオン化モードにおいては, 先のメタノール/水の場合と同様にシンプルなマススペクトルが得られることが分かった.

Fig. 1 に 6 種の有機酸ヒドラジドに対して, 移動相としてメタノール/水及びメタノール/ギ酸アンモニウムを用いた場合の正及び負イオン化モードでの感度比を示す. Table 1 から Table 4 までの条件における各有機酸ヒドラジドの検出感度は, メタノール/水を移動相として用いて負イオン化モードで検出する方法が最も高感度であった.

Table 4 Relative intensities of the negative-ions in ESI mass spectra of 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids

Carboxylic acid	Retention time/ min	m/z (relative intensity, %)			
		$[M-H]^-$	$[M+Cl]^-$	$[M+EtOH-H]^-$	$[M+90-H]^-$
Acetic acid	4.8	194 (100)	230 (3.9)	240 (7.4)	284 (1.6)
Propionic acid	5.7	208 (100)	244 (5.1)	254 (6.1)	298 (1.2)
<i>n</i> -Butyric acid	6.9	222 (100)	258 (5.1)	268 (5.2)	312 (1.1)
Glycolic acid	4.5	210 (100)	246 (2.4)	256 (3.5)	300 (1.8)
(L)-(+)-Lactic acid	4.8	224 (100)	260 (1.6)	270 (3.5)	314 (1.8)
DL-2-Hydroxy- <i>n</i> -butyric acid	5.2	238 (100)	274 (3.9)	284 (3.1)	328 (1.1)

LC/MS conditions: mobile phase, methanol/20 mM ammonium formate (50 : 50); ionization mode, ESI-negative; cone voltage, 20 V

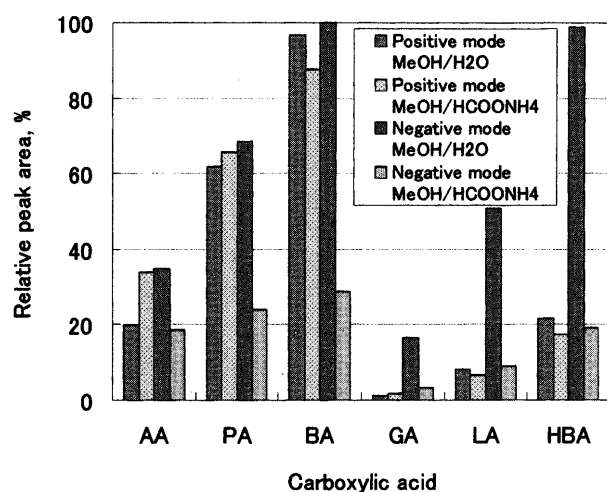


Fig. 1 Effects of mobile phase and ionization mode on appearance of ion currents of molecular-related ions of 2-nitrophenylhydrazides of each carboxylic acid

LC/MS conditions: ■, Mobile phase, methanol-water; ionization mode, ESI-positive; ▨, mobile phase, methanol-20 mM ammonium formate; ionization mode, ESI-positive; ■, mobile phase, methanol-water; ionization mode, ESI-negative; ▨, mobile phase, methanol/20 mM ammonium formate; ionization mode, ESI-negative

LC/MSにおいては、移動相成分や試料中の未反応試薬由来のイオンがマススペクトル上に反映される可能性があり、定量の精度を考慮すると、シンプルなスペクトルを与えるほうが望ましいと考えられる。ここまでの検討では、メタノール/水を移動相としたときの負イオン化モードによる検出方法が、検出感度及び得られるスペクトルの面から最も適当であると考えられるが、数種の有機酸ヒドラジドのピークがリーディングを起しており、定量精度に問題を残す。この結果より本研究では、定量の際に観察する基準イオンとして、メタノール/水を移動相とした負イオン化モードでの $[M-H]^-$ イオン、及びメタノール/ギ酸アンモニウムを移動相とした正イオン化モードでの $[M+H]^+$ イオンを用いる方法について最適化を図ることとした。

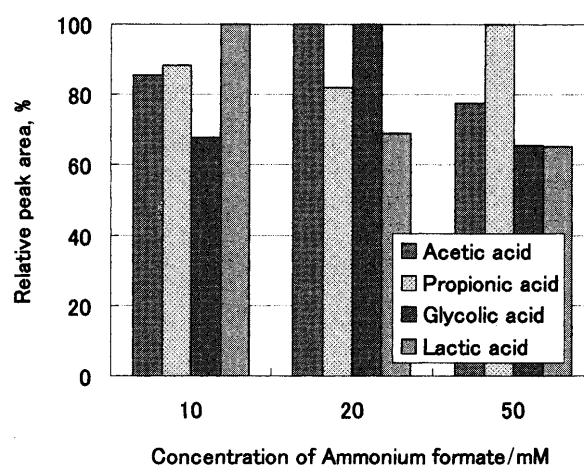


Fig. 2 Effects of the concentration of ammonium formate on appearance of ion currents of protonated molecules of 2-nitrophenylhydrazides of each carboxylic acid

■, Acetic acid; ▨, Propionic acid; ■, Glycolic acid; ▨, Lactic acid; LC/MS conditions: Mobile phase, methanol/ammonium formate (50 : 50); Ionization mode, ESI-positive

3・2 塩濃度及び pH 値の最適化

LC/MS 計測において、LC の分離パターンを向上させるために移動相に緩衝溶液を加えることが多く行われるが、一方でこの移動相に加える緩衝溶液の組成が質量分析計 (MS) の検出感度へも影響を及ぼす。本研究では移動相に加える緩衝溶液としてギ酸アンモニウムを用い、その塩濃度及び pH が、LC の分離パターン及び MS の検出感度に与える影響を調べた。その結果、負イオン化モードにおいては既に Fig. 1 に示したように、緩衝溶液を加えることでピークのリーディングは解消されるものの感度の低下が観察された。

Fig. 2 に 4 種類の有機酸ヒドラジドに対する緩衝溶液の塩濃度が MS の検出感度に与える影響を、Fig. 3 に緩衝溶液の pH が MS の検出感度に与える影響を示した。この結果から分かるように、正イオン化モードにおいては、ギ酸アンモニウムの塩濃度及び pH がいずれも LC の分離パタ

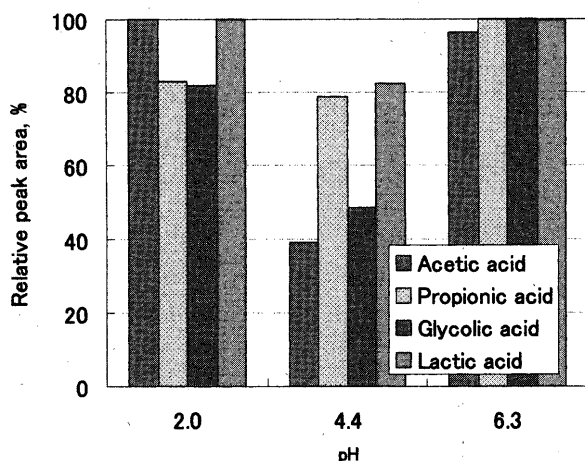


Fig. 3 Effects of pH in mobile phase on appearance of ion currents of protonated molecules of 2-nitrophenylhydrazides of each carboxylic acid

■, Acetic acid; □, Propionic acid; ■, Glycolic acid; ■, Lactic acid; LC/MS conditions: mobile phase, methanol/20 mM ammonium formate (50 : 50); ionization mode, ESI-positive.

ーンにほとんど影響を与えず, MS の検出感度に対して大きな影響を与えることが判明した. この結果から, 正イオン化モードにおいて, 各有機酸ごとに個別の最適な緩衝溶液の塩濃度及び pH が存在することが示唆され, 定量の際には一斉分析を考慮し, 各有機酸に対して平均的高感度を得た 20 mM ギ酸アンモニウム (pH 6.3) を移動相の緩衝溶液として用いることとした.

3.3 コーン電圧の最適化

ESI イオン化 LC-MS におけるイオン化効率の最適化にかかわる MS 条件のパラメーターは幾つか存在するが, ここではイオン化効率に最も影響を与えるコーン電圧について検討を行った. 各有機酸ヒドラジドについて, 正及び負イオン化の両モードにおいて 10~35 V の間でコーン電圧を変化させ, 検出された基準ピークの面積値をモニターした. Fig. 4 は正イオン化モードにおいて酢酸, プロピオン酸, グリコール酸及び L-(+)-乳酸ヒドラジドのピーク面積にコーン電圧が与える影響を示したものであり, Fig. 5 は負イオン化モードにおける上記の酸ヒドラジドのピーク面積にコーン電圧が与える影響を示したものである. その結果, 正イオン化モードにおいてはモノカルボン酸のヒドラジドが 25 V で, ヒドロキシカルボン酸のヒドラジドが 20 V でピーク面積最大を示し, 負イオン化モードにおいてはすべての有機酸が 20 V でピーク面積値が最大となった. また 40 V 以上のコーン電圧を与えることで, 酸ヒドラジドに由来するフラグメントイオンがスペクトル上で確認されたが, いずれも基準イオンの感度を超えるイオンは得ることができなかった.

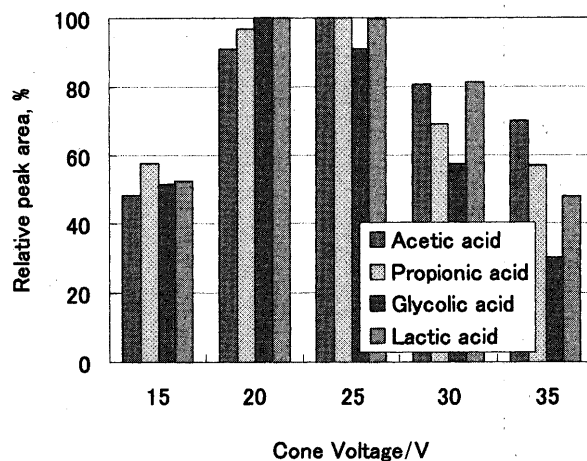


Fig. 4 Effects of cone voltage on appearance of positive ion currents of protonated molecules of 2-nitrophenylhydrazides of each carboxylic acid

■, Acetic acid; □, Propionic acid; ■, Glycolic acid; ■, Lactic acid; LC/MS conditions: mobile phase, methanol/20 mM ammonium formate (50 : 50); ionization mode, ESI-positive

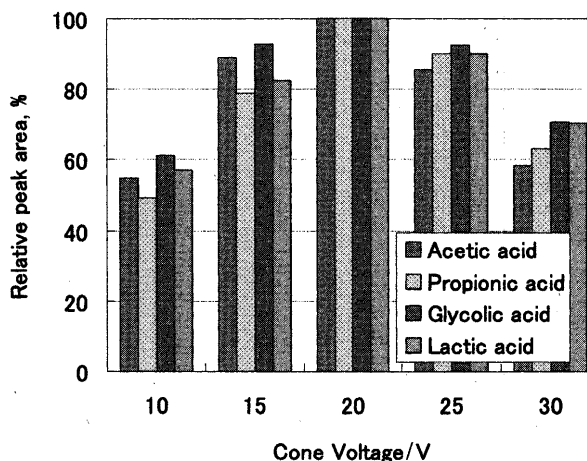


Fig. 5 Effects of cone voltage on appearance of negative ion currents of deprotonated molecules of 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids

■, Acetic acid; □, Propionic acid; ■, Glycolic acid; ■, Lactic acid; LC/MS conditions: mobile phase, methanol/water (50 : 50); ionization mode, ESI-negative

3.4 有機酸ヒドラジド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, 各有機酸ヒドラジドの LC/MS 分析における検出限界を測定した. その結果, モノカルボン酸のヒドラジドについては正及び負イオン化モード共に, TIC モードにおいて有機酸濃度として 34~99 nM のオーダーで, SIM モードにおいては 1.4~5.0 nM のオーダーで検出することが可能であった. 一方, ヒドロキシカルボン酸の検出限界については, 正イオン化モードに

Table 5 Limit of detection (LOD) of 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids with positive TIM and SIM mode

Carboxylic acid	Monitoring ion (<i>m/z</i>)	LOD	
		TIM mode/nM	SIM mode/nM
Acetic acid	196	103	6.1
Propionic acid	210	53	2.4
<i>n</i> -Butyric acid	224	40	2.2
Glycolic acid	212	1986	105
(L)-(+)-Lactic acid	226	530	25
DL-2-Hydroxy- <i>n</i> -butyric acid	240	199	15

LC/MS conditions: mobile phase, methanol/20 mM ammonium formate (50 : 50); ionization mode, ESI-positive

Table 6 Limit of detection (LOD) of 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids with negative TIM and SIM mode

Carboxylic acid	Monitoring ion (<i>m/z</i>)	LOD	
		TIM mode/nM	SIM mode /nM
Acetic acid	194	99	5.0
Propionic acid	208	50	2.3
<i>n</i> -Butyric acid	222	34	1.4
Glycolic acid	210	207	9.7
(L)-(+)-Lactic acid	224	68	3.1
DL-2-Hydroxy- <i>n</i> -butyric acid	238	35	1.4

LC/MS conditions: mobile phase, methanol/water (50 : 50); ionization mode, ESI-negative

においてはモノカルボン酸の LOD に対して 10 倍程度低い結果であったが、負イオン化モードにおける測定ではモノカルボン酸と同程度の検出限界を得た。これらの酸ヒドラジドについて正イオン化モードにおける検出限界を Table 5 に、負イオン化モードにおける検出限界を Table 6 に示した。また、負イオン化モードにおいてプロピオン酸及び L-乳酸について酸ヒドラジドの検量線を作成したところ、それぞれ有機酸濃度として 0.05~10 μ M と 0.2~10 μ M の間で直線性の高い検量線（相関係数: 0.998）が得られた。

本法においては有機酸の一斉分析が可能であり、Fig. 6 に 6 種の有機酸混合試料を、負イオン化モードを用いて測定したマスクロマトグラムを示す。

3.5 従来の検出法との感度比較

酸ヒドラジド誘導体における LC/MS での検出感度と、従来の UV400 nm での検出感度を比較したところ、負イオン化モードの SIM モードを用いた測定では、すべての酸ヒドラジドについて LC/MS のほうが UV 法よりも数倍から数十倍検出感度が高いという結果を得た。これは有機酸の種類によって若干差があり、例えばプロピオン酸において 46 倍、乳酸において 14 倍ほどの感度の向上が見られた。また同じ酸ヒドラジドの UV230 nm による検出限界と比べても、LC/MS における検出感度はそんな色ないのであることが分かった。

以上本研究により、有機酸に対する 2-NPH 誘導体化法による LC/MS が、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。誘導体化法の適用性から考えればジカルボン酸も対象となり得るが、今後より広範囲の有機酸に対する LC/MS 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。

(2002 年 5 月, 第 63 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) 戸塚新一, 松田 恒, 佐藤孝義, 皆川憲夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 927 (1996).
- 2) 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).
- 3) 田中 茂, 安江憲介, 橋本芳一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **39**, 13 (1990).
- 4) 山田 悦, 田口秀之, 佐藤昌憲: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 995 (1994).
- 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).

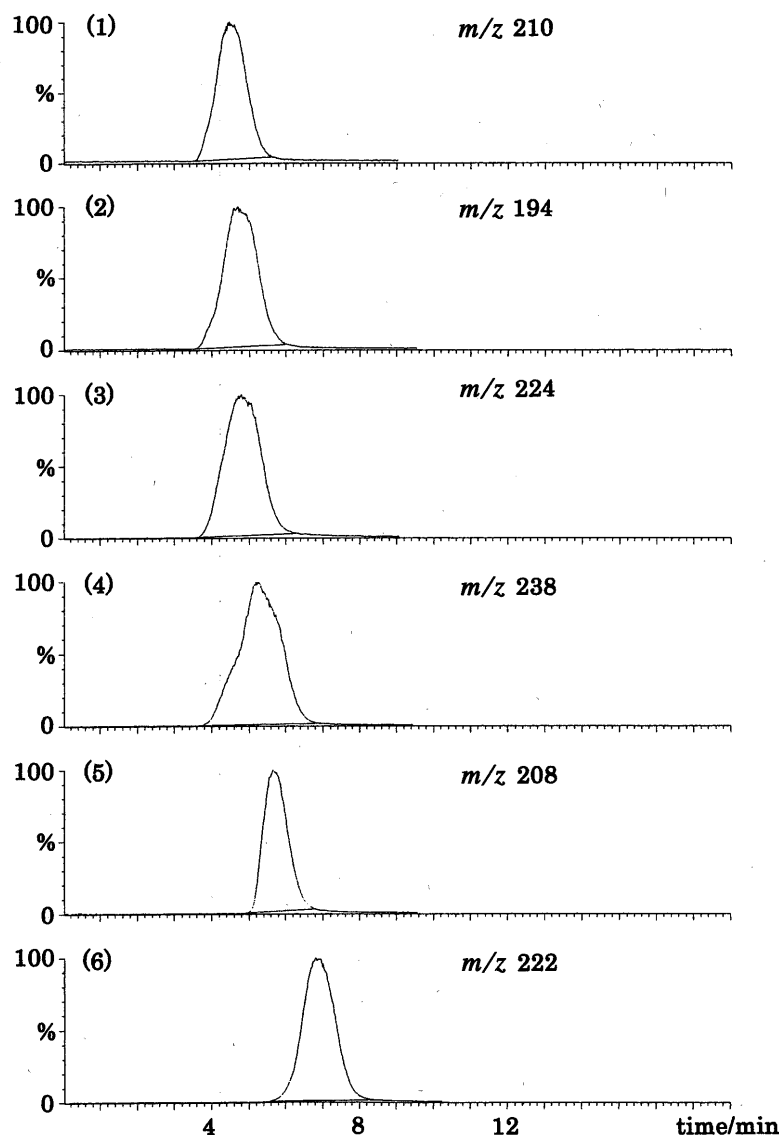


Fig. 6 Mass chromatograms of six 2-nitrophenylhydrazides of carboxylic acids by SIM mode with negative ESI

(1): Glycolic acid; (2): Acetic acid; (3): Lactic acid; (4): 2-Hydroxy-*n*-butyric acid; (5): Propionic acid; (6): *n*-Butyric acid; LC conditions: mobile phase, methanol/water (50 : 50)

要 旨

本研究では、低分子有機酸の定量を目的として、有機酸の2-ニトロフェニルヒドラジド(2-NPH)誘導体に着目し、その液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)の有効性を検討するために、基礎的なデータの収集と高感度検出のための条件検討を行った。モノカルボン酸である酢酸、プロピオン酸、及び *n*-酪酸、ヒドロキシカルボン酸であるグリコール酸、乳酸、及び2-ヒドロキシ-*n*-酪酸の6種の有機酸は、いずれもヒドラジド誘導体を形成し、正イオン化モード及び負イオン化モードでマススペクトルを測定したところ、すべての有機酸ヒドラジドについて、マススペクトル上 $[M+H]^+$ 及び $[M-H]^-$ イオンが観察された。移動相の種類、塩濃度及び pH について検討したところ、メタノール/水を移動相として負イオン化モードで測定する場合に最も高感度な検出が可能であり、ヒドロキシカルボン酸においては、正イオン化モードより負イオン化モードによる検出が10倍程度高感度であることが分かった。分析条件を最適化した上で検出感度 ($S/N=3$) を求めたところ、反応に用いる有機酸濃度として1.4~9.7 nM という結果を得た。これは従来の吸光度検出(UV-VIS 400 nm)による検出より高感度であり、有機酸2-NPH誘導体のLC/MS分析の有効性が示唆された。