

ACQUITY UPLC H-Class PLUS および ACQUITY QDa 質量検出器を用いたさまざまな飲料中の 14 種の有機酸の分析

Dimple D. Shah, Kerri M. Smith, Jinchuan Yang, Peter Hancock

Waters Corporation

要約

有機酸は天然に存在するか、飲料、食品、飼料の生産に頻繁に使用されます。酸性添加剤は、バッファーとして作用して、酸性度、抗酸化剤、防腐剤、風味増強剤、金属イオン封鎖剤を調整することがあります¹。有機酸のプロファイルはさまざまな飲料ごとに異なり、食品や飲料の知覚的特徴に寄与して香りや味を付加します。飲料中の有機酸をモニターすることは、品質管理を確認するために有用であり、成分が製品仕様の範囲内であることを確認することは、味を一貫させ、フルーツジュースの真正性と純度を評価するために有用です。

ACQUITY QDa などのシングル四重極型質量検出器は、UV-Vis などの光学検出器と比較していくつかの利点があります。そのような利点には、選択性の向上、より低い検出限界、サンプルの成分の質量スペクトル情報を収集できる能力などがあります。このアプリケーションノートでは、ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムを使用して 14 種の有機酸を分離する方法に、焦点を合わせます。この分析は、ACQUITY QDa 質量検出器を搭載した ACQUITY UPLC H-Class PLUS で行いました。ACQUITY QDa 質量検出器を使用することで、分析法の選択性が向上し、その結果、サンプルマトリックスの共溶出が分析に及ぼす影響が低減され、ターゲットの有機酸の波形解析が簡単になり分析がより正確になります。

この分析法を、保持、ピーク形状、安定性、直線性について評価し、検討しました。すべての被験分析種について、このカラムにより許容範囲内のクロマトグラフィー保持が示されました。この分析法を、さまざまなフルーツジュース、ワイン、栄養ドリンク、スポーツドリンク、スパークリングウォーターのサンプルで試験しました。ACQUITY Premier カラムを ACQUITY UPLC-QDa と組み合わせることにより、被験有機酸について、従来の HPLC 分析法と比較して、十分な保持時間、良好な分離、サンプル分析時間の短縮が達成されました。

アプリケーションのメリット

- ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムにより、分析種の金属表面との相互作用が緩和されます。ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムによる優れた分析法再現性
- サンプルの誘導体化、イオン対試薬、バッファー移動相の必要なしで 14 種の有機酸を分析するための、単一のクロマトグラフィー分析法
- ACQUITY QDa 質量検出器のシングルイオンレコーディング (SIR) 取り込みモードでの使用により、選択性と感度が向上し、共溶出するマトリックス化合物からのクロマトグラフィー干渉が低減される
- 被験有機酸について許容可能な保持およびクロマトグラフィー分離能が得られる
- フルーツジュース、ワイン、栄養ドリンク、スパークリングウォーターなど、複数種類の飲料サンプルに対する単一の分析法
- 分析時間が 1 サンプルあたり 11 分未満の効率的なサンプル分析

はじめに

有機酸は天然に存在するか、酸味料、香味料、保存料として、飲料に添加されることがあります。有機酸は、飲料に、香り、味、特徴的な風味を付けることにより、重要な役割を果たします。地理的起源や成熟段階の違いが、さまざまな種類の果物に存在する有機酸の量と種類に影響します。有機酸のプロファイリングおよび定量は、フルーツジュースの含有率の判定、フルーツジュースの不当表示や偽装の検出、および品質管理目的で、飲料に対する有用な試験です。有機酸は、処理や保管の間にあまり変化しないため、果物ベースの製品の真正性の指標として有用です²。

有機酸は非常に極性が強い化合物であり、従来のシリカ C₁₈ 逆相カラムで保持しにくく、その分析は困難な課題です。多くの公開されている分析法では、飲料中の有機酸の測定に、イオンクロマトグラフィー (IC)、キャピラリー電気泳動 (CE)、または滴定法が推奨されています。イオンクロマトグラフィー分析法では、通常、分析時間が長く、特殊な装置が必要です。古い HPLC 分析法では、有機酸の保持および分離に逆相 C₁₈ カラムが使用され、UV-Vis または PDA が多くの場合検出に使用されます。

有機酸は構造と特性が互いに似ているため、特に UV や PDA 検出器などの従来の分析法で分析する場合に、有機酸の相互間およびマトリックス成分からのベースライン分離が重要になります。HPLC の使用での課題の 1 つは、カラムを含む分析流路の表面との相互作用により、一部の有機酸の検出およびピーク形状が損なわれる可能性があることです。許容できる有機酸のピーク形状、保持、および相互間の分離を達成することは困難な課題である場合があり、サンプルからの共溶出成分の存在により、有機酸のルーチン分析がさらに複雑になることがあります。

このアプリケーションノートでは、さまざまな飲料中の 14 種の有機酸の分析について説明します。これらの分析種の分離を、ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムで行い、分析は、ACQUITY QDa 質量検出器と組み合わせた ACQUITY UPLC H-Class PLUS システムで行いました。ACQUITY Premier カラムに組み込まれた MaxPeak HPS テク

ノロジーにより、分析種間およびクロマトグラフィー流路との相互作用が低減され、ピーク形状および感度の向上が実現します。ACQUITY QDa 質量検出器を使用することで、移動相組成を簡素化することができ、高い mM 濃度のバッファが不要になりました。ACQUITY QDa 質量検出器により、有機酸の検出が可能になり、UV または PDA 検出器と比較して感度が向上します。

分析法の性能を評価するいくつかの性能基準（保持時間、分離、感度、直線性）を評価しました。この分析法を使用し、さまざまなフルーツジュース、ワイン、栄養ドリンク、スポーツドリンク、スパークリングウォーター、エネルギーブースター中の有機酸を測定しました。

実験方法

標準試料の前処理

14 種の有機標準試料を MilliQ 水に 10 mg/mL に溶解して、ストック溶液を個別に作成しました。個々の有機酸ストック溶液を混合し、MilliQ 水で希釈して、600 µg/mL (ppm) に、すべての有機酸の混合液を調製しました。溶媒検量線は、有機酸混合ストック溶液を MilliQ 水で連続希釈した 0.2 ~ 200 µg/mL の範囲で作成しました。

サンプル前処理

オレンジジュース、リンゴジュース、赤ワイン、2 種類の栄養ドリンク、スポーツドリンク、スパークリングウォーターを、MilliQ 水で 10 倍に希釈しました。エネルギーブースター粉末については、9.1 グラムを 119 mL の MilliQ 水に溶解し、パッケージの記載に従って調製しました。希釈したエネルギーブースターをさらに MilliQ 水で 100 倍および 500 倍に希釈しました。すべてのサンプルを水で希釈した後、ろ過しました。

UPLC 質量検出器

UPLC システム:	ACQUITY UPLC H-Class PLUS (FTN サンプルマネージャを搭載)
質量検出器:	ACQUITY QDa
カラム:	ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラム、1.7 µm、2.1 × 100 mm (製品番号: 186009475)
ソフトウェア:	Empower 3 CDS
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液 (LC-MS グレード)

移動相 B:	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液 (LC-MS グレード)
注入量:	5 μ L
カラム温度:	50 $^{\circ}$ C
サンプル温度:	10 $^{\circ}$ C
分析時間:	11 分 (平衡化を含む)
バイアル:	Waters トータルリカバリー、不活性型 (製品番号 : 186000385DV)

MS 条件

MS 装置:	ACQUITY QDa 質量検出器 (パフォーマンス)
イオン化:	ESI
極性:	ネガティブイオンモード
キャピラリー電圧:	0.8 V
コーン電圧:	5.0 V
プローブ温度:	600 $^{\circ}$ C
SIR 質量:	表 2 を参照

有機酸	モノアイソトピック質量 (Da)	SIR 質量 [M-H] ⁻ (m/z)
乳酸	90.03	89
コハク酸	118.03	117
グルタル酸	132.04	131
キナ酸	192.06	191
イソクエン酸	192.03	191
クエン酸	192.03	191
フマル酸	116.01	115
マレイン酸	116.01	115
アスコルビン酸	176.03	175
アジピン酸	146.06	145
シキミ酸	174.05	173
トランスアコニット酸	174.02	173
cis-アコニット酸	174.02	173
酒石酸	150.02	149
リンゴ酸	134.02	133

表 2. 14 種の被験有機酸と 5 種の内部標準試料のモノアイソトピック質量およびシングルイオンレコーディング (SIR) 質量

表 2 に概要が記載されている有機酸標準試料の混合物を、ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムを用いて分析しました。それぞれに 0.1% ギ酸が含まれている水とアセトニトリルで構成される単純な移動相を用いるグラジエントメソッドを、使用しました。すべての被験有機酸を、[M-H]⁻ を生成するネガティブエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いる ACQUITY QDa 質量検出器 を使用して、検出しました。すべての有機酸のシングルイオンレコーディング質量 (SIR) または分子イオン質量対電荷比 (m/z) が、表 2 に示されています。

結果および考察

有機酸のクロマトグラフィーは、ターゲット分析種とクロマトグラフィー流路の金属表面の間の相互作用の影響を受ける可能性があります。これらの相互作用により、ピークテーリングが増加し、ピーク面積が減少することがあります。LC システムとカラムを不動態化することによって分析種と金属表面の間の相互作用を最小限に抑えるために利用できる手順が、いくつかあります。不動態化メソッドには時間がかかり、追加の溶媒が必要であり、分析法のセットアップ

に余分な時間とコストが追加されます。金属との相互作用に対処する別のアプローチは、移動相に添加剤を使用することです。ただし、これらの添加剤はイオン化抑制やクロマトグラフィーの変化の原因になり、分析法の性能に影響を与えることがあります。ウォーターズは、システムやカラムの不動態化などの時間のかかる作業を行うことなく、金属の影響を受けやすい分析種に関連するばらつきを低減するように設計した、新しい低吸着 ACQUITY Premier システムとカラムを開発しました。クエン酸は、よく知られたキレート剤であり、金属に結合します。図 1 に、ACQUITY Premier UPLC システムおよびカラムでのクエン酸 (RT 1.54 分) のクロマトグラフィー性能が、標準的な UPLC システムおよびカラムを使用した場合と比較して示されています。ACQUITY Premier カラムおよびシステムを使用することで、ピーク面積が 5 倍増加し、ピーク形状が改善されることが観察されました³。ACQUITY Premier カラムを従来の UPLC システムで使用した場合にも、ピーク形状と感度の改善が観察されました。

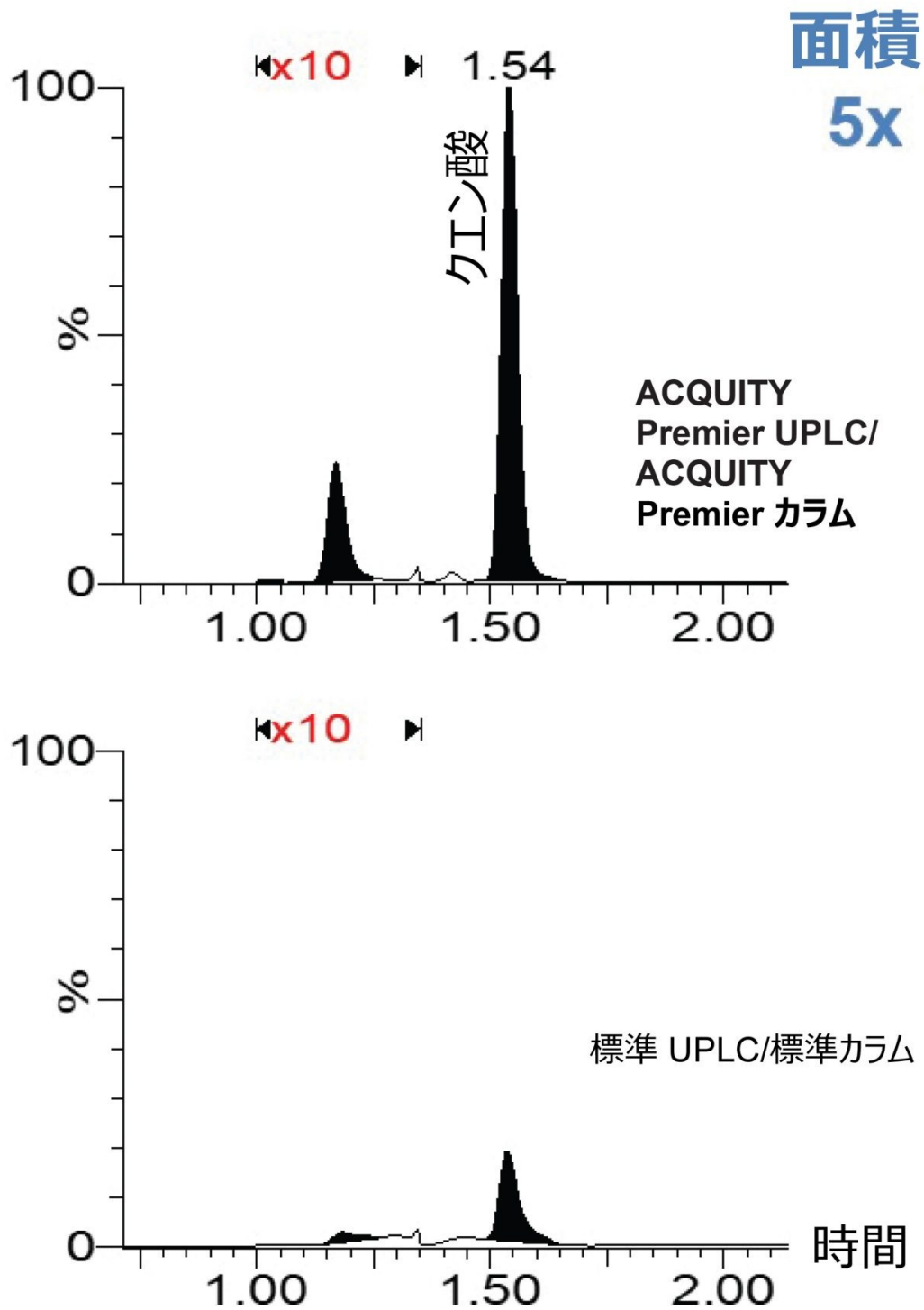


図 1. 標準カラム

および標準システムと比較した場合の、ACQUITY Premier システムおよびカラムの使用による、クエン酸のピーク面

積の改善 (LC-MS データ)

14 種の有機酸すべてをベースライン分離し、飲料製品の他の成分との共溶出を回避することは、困難な課題である可

能性があります。ACQUITY QDa 質量検出器を SIR モードで使用することで選択性が向上し、すべての分析種のベース

ライン分離は必要でなくなる可能性があります。UV-Vis などの光学検出器を使用する分析法では、すべての分析種に

ついてベースライン分離が必要であり、共溶出が発生する可能性があります。これにより、一貫した波形解析に対する困難な課題が生じる可能性があります。

図 2 に、UPLC-PDA 分析法で生成されたクロマトグラムが示されています⁴。この分析法では、有機酸を検出するために、バッファー移動相が必要です。UPLC-PDA 分析法では、検出するためにバッファー移動相が必要です。PDA 検出器では、移動相バッファーまたは添加物と対象分析種との間に、吸光度の差があることが不可欠です。吸光度がギ酸と類似 (210 nm) の有機酸は、移動相のバックグラウンドノイズと識別できず、ベースラインが高くなります。このため、ギ酸を用いて開発された LC-QDa 分析法は UPLC-PDA 検出器には使用できません。UPLC-PDA 分析法 (図 2) で示されているように、アスコルビン酸がリンゴ酸と、マレイン酸がアジピン酸と、それぞれ共溶出します。図 3 に、ACQUITY QDa 質量検出器を使用した 14 種の有機酸の分離が示されています。

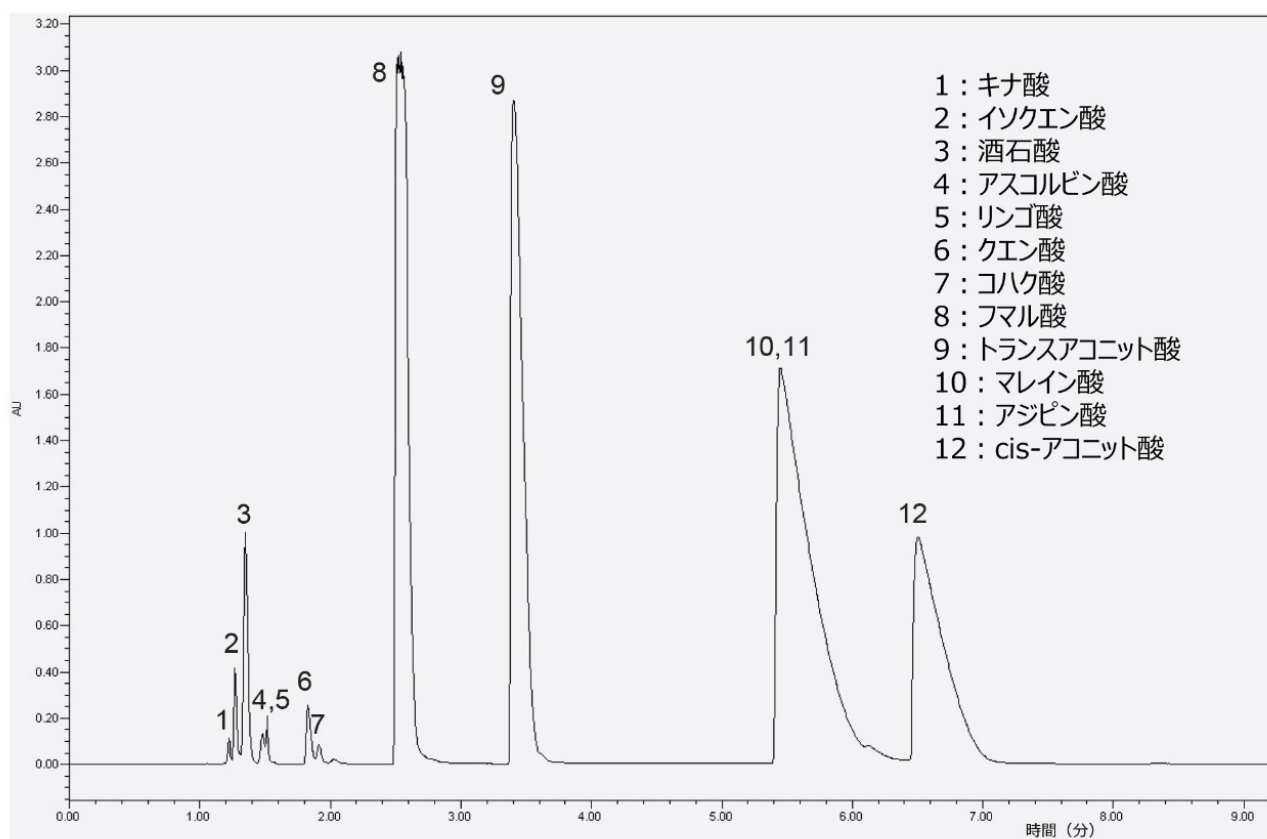


図 2. UPLC-PDA 検出器を使用したさまざまな有機酸のクロマトグラムの例

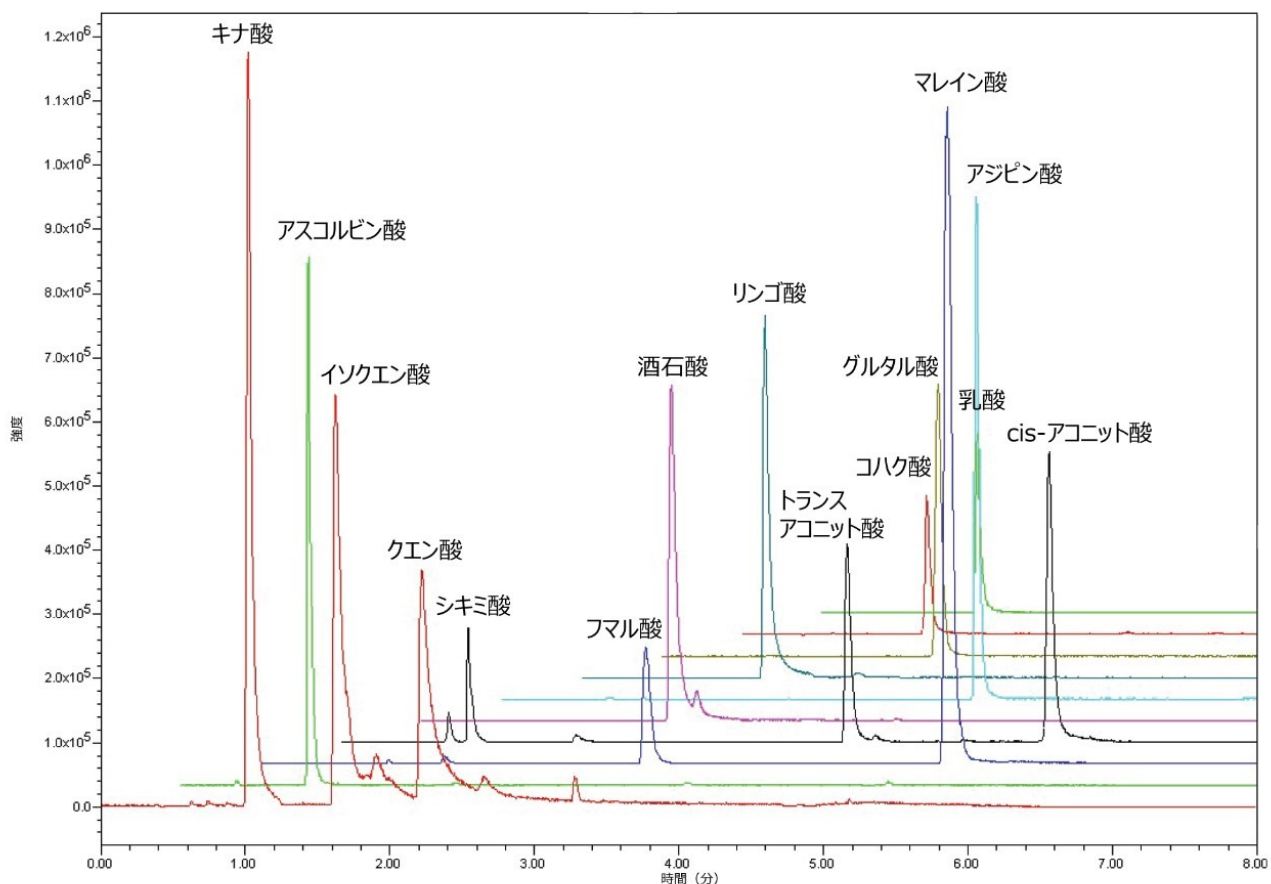


図 3. ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムを使用した、6 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) の 14 種の有機酸のクロマトグラフィー分離。各化合物のクロマトグラムが、単一のプロットに、時間軸でオフセットして重ね描きされています。質量検出を使用すると UV-Vis よりも特異性が高くなりますが、一部の主要なベースライン分離は必要なままです。これらの有機酸の分子イオン $[\text{M}-\text{H}]^-$ の一部は、質量電荷比 (m/z) が類似しています。例えば、キナ酸、クエン酸、イソクエン酸は m/z 191、シキミ酸、およびアコニット酸の 2 種類の異性体 (トランスおよびシス) は m/z 173、フマル酸とマレイン酸は m/z 115 です。イソクエン酸はクエン酸の構造異性体であるため、これら 2 種の有機酸の間のベースライン分離は重要です。

同じ m/z の有機酸が同じ SIR チャンネルで検出され、それらが互いに十分な分離度で分離されていることが確認されました。図 4 に、溶媒標準液中でのこれらの分析種のベースライン分離が示されています。

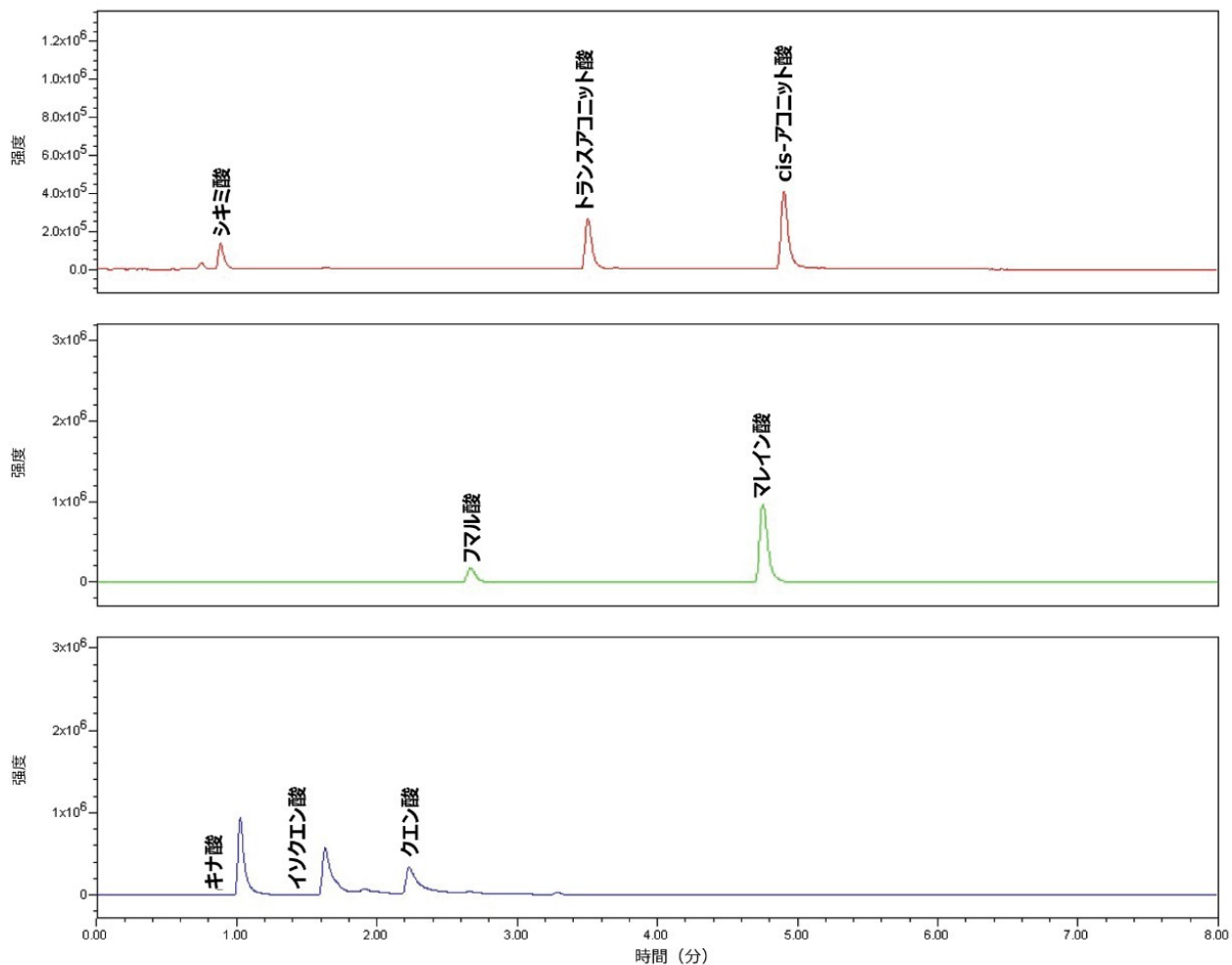


図 4. シキミ酸、トランスアコニット酸、シスアコニット酸（赤線）、フマル酸とマレイン酸（緑線）、キナ酸、イソクエン酸、クエン酸（青線）のベースライン分離

この方法の性能を評価するため、いくつかの飲料サンプルを試験して有機酸プロファイルを決定しました。サンプル前処理のセクションで概説されているように、サンプルは、希釈およびフィルター処理してから分析しました。

栄養ドリンクのサンプル

3種の栄養ドリンクのサンプルを試験し、クエン酸がこのサンプル中の主な有機酸であることがわかりました。クエン酸は、多くの場合風味増強剤として飲料に添加され、これによって酸味が加わります。クエン酸は、3種類の試験した栄養ドリンクすべての成分リストに記載されていました。ACQUITY QDa 質量検出器の選択性と感度が増加したことにより、サンプルAで、低濃度のリンゴ酸と乳酸が検出されました。一方、サンプルCでは、リンゴ酸、アスコルビン酸、および低濃度の酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、マレイン酸が検出されました。3種類のサンプルすべてで、同定された有機酸がそれらの成分リストに記載されていました。図 5A、5B、5C に、栄養ドリンクのサンプルA、サンプルB、サンプルCで見つかった有機酸が、示されています。

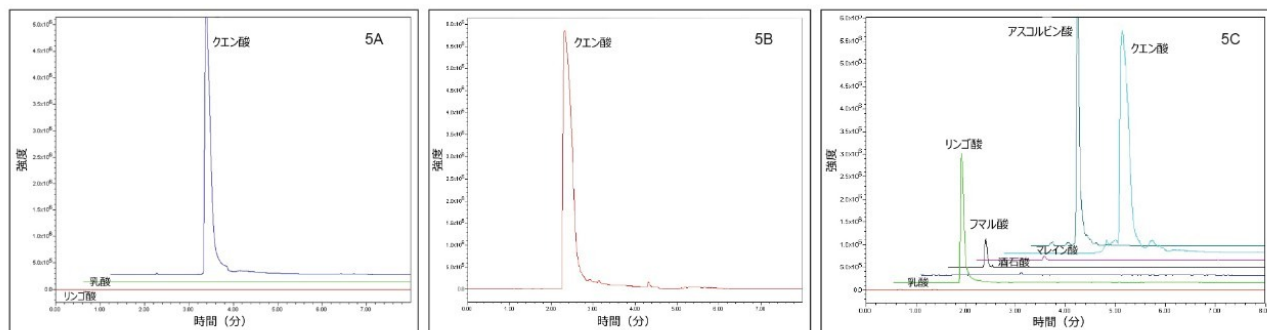


図 5. 栄養ドリンクサンプル A (5A)、サンプル B (5B)、サンプル C (5C) 中に検出された有機酸

スポーツ飲料とスパークリングウォーター

試験したスポーツドリンクサンプルには、ラベルに記載されている主要な有機酸としてクエン酸が含まれていました。スポーツドリンクサンプル中に、クエン酸とともに、より低い濃度のリンゴ酸とトランスアコニット酸も検出されました。乳酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、キナ酸が、スパークリングウォーターサンプル中に低濃度で検出されました。図 6A および 6B に、試験したスポーツドリンクおよびスパークリングウォーターに含まれている有機酸が示されています。

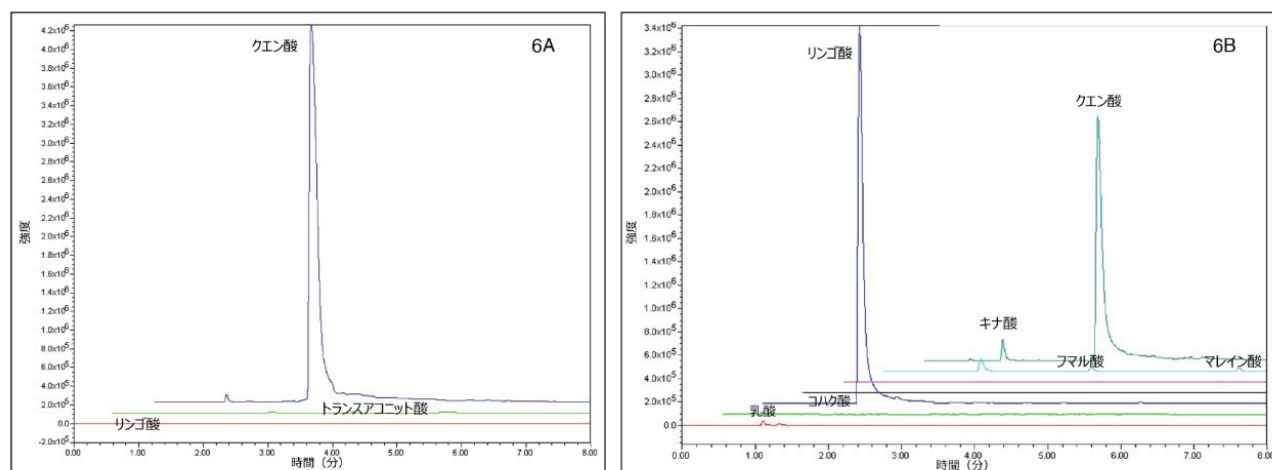


図 6. スポーツドリンク (6A) およびスパークリングウォーター (6B) 中に検出された有機酸

赤ワイン

酒石酸、コハク酸、乳酸は主に赤ワインに含まれていました。赤ワインのサンプルには、シキミ酸、キナ酸、クエン酸、シスアコニット酸およびトランスアコニット酸、リンゴ酸など、他の低濃度の有機酸が含まれていることがわかりました。SIR は UV-Vis より高い選択性を提供し、これによりマトリックス干渉の影響が低減され、赤ワインサンプル中の低濃度の有機酸の検出と波形解析が簡単になります。開発したこの分析法は、さまざまなワインの有機酸プロファイルの試験および比較に適用できる可能性があります。

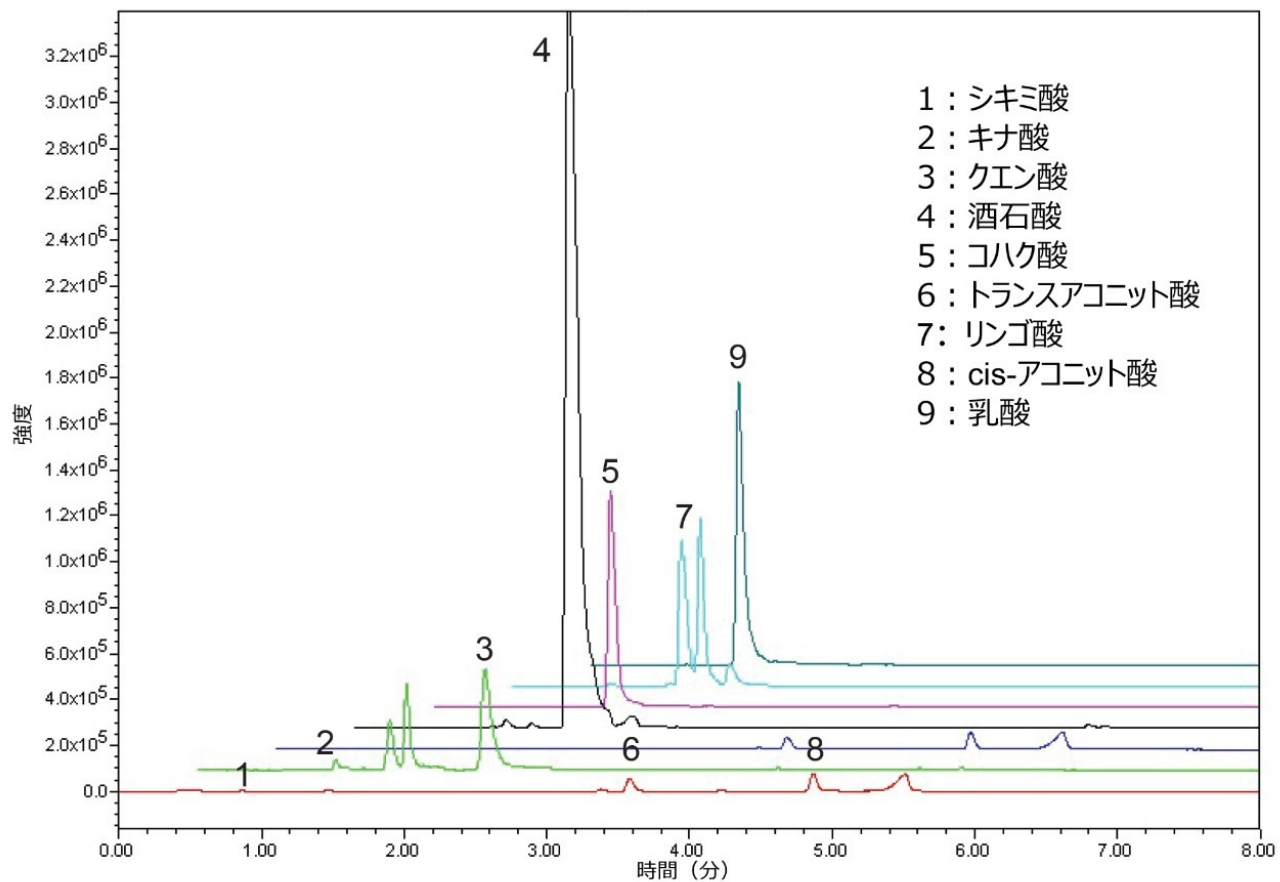


図7. 赤ワインサンプル中に検出された有機酸

フルーツジュース：オレンジジュースとリンゴジュース

リンゴ酸、クエン酸、キナ酸は、リンゴジュースで検出される最も一般的な有機酸です。ただし、ACQUITY QDa 質量検出器を使用して、これらの酸とともに一部の低濃度の有機酸も検出されました。クエン酸は、オレンジジュース中に高濃度で検出されました。オレンジジュース中には、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、キナ酸、イソクエン酸、酒石酸、フマル酸、トランスアコニット酸およびシスアコニット酸、アスコルビン酸も検出されました。

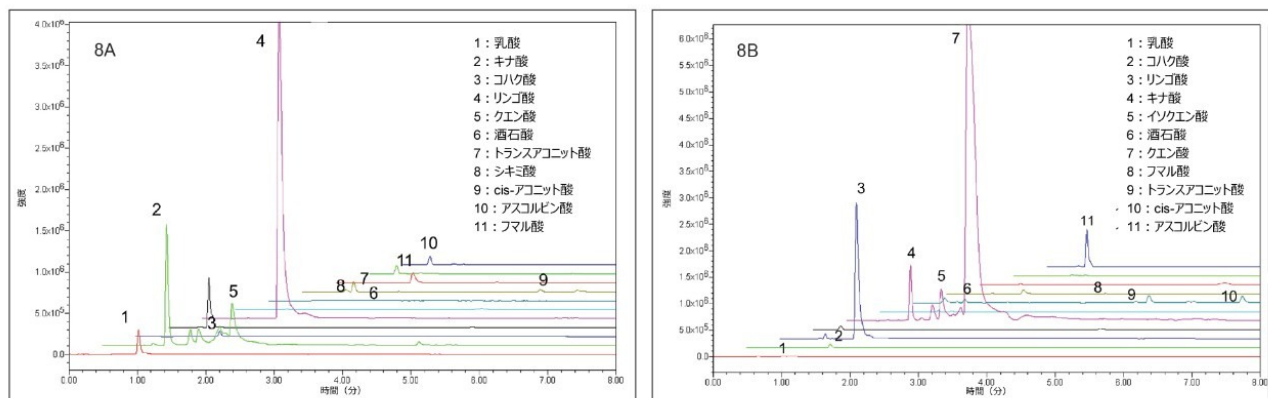


図 8. リンゴジュース (8A) およびオレンジジュース (8B) 中に検出された有機酸

この分析法の再現性を、栄養ドリンクの 50 回連続注入 (サンプル G) で試験しました。図 9 に、サンプル中に存在するクエン酸の保持時間とピーク面積が示されています。50 回の注入にわたる保持時間およびピーク面積の %RSD は、それぞれ 0.3% および 1.9% でした。

結論

- このアプリケーションノートでは、14 種の有機酸の分析に使用した、サンプル前処理が簡単で非バッファー移動相を用いる UPLC-MS 分析法について紹介しました。
- ACQUITY Premier カラムでは、従来のカラムと比較して、クロマトグラフィーのピーク形状と感度の向上が示されました。
- ACQUITY QDa 質量検出器により、UV または PDA 検出器と比較して、選択性と感度が向上します。これにより、飲料サンプル中の、低濃度で存在する有機酸および高濃度で存在する有機酸をともに検出できます。
- この分析法により、さまざまなフルーツジュース、ワイン、スポーツドリンク、栄養ドリンク中の有機酸を分離し、検出することができました。
- この分析法により栄養ドリンクサンプルの 50 回の注入にわたって、クエン酸の保持時間およびピーク面積の優れた再現性が得られることが示されました。

参考文献

1. Jiaxiu Li, Chunling Zhang, Hui Liu, Jiechao Liu, and Zhonggao Jiao. Profiles of Sugar and Organic Acid of Fruit Juices: A Comparative Study and Implication for Authentication,

<https://www.hindawi.com/journals/jfq/2020/7236534/> <

<https://www.hindawi.com/journals/jfq/2020/7236534/>>.

2. Camara MM, Diez C, Torija ME and Cano MP.(1994).HPLC Determination of Organic Acids in Pineapple Juices and Nectars.Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, *China Eur.Food Res.Technol.*198:52–56.*Journal of Food Quality* Volume 2020, Article ID 7236534, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2020/7236534> <<https://doi.org/10.1155/2020/7236534>>.
3. Kerri M. Smith, Paul D. Rainville.Utilization of MaxPeak High Performance Surfaces for Improved Separation and Recovery of Analytes Associated with the Tricarboxylic Acid Cycle.Waters Application Note, Revised 2020, [720006727](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-analytes-by-mixed-mode-chromatography-mass-spectrometry.html) <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-analytes-by-mixed-mode-chromatography-mass-spectrometry.html>>.
4. Dimple Shah.Fast, Accurate and Flexible LC-PDA Method for the Determination of Citric Acid In Beverages.Waters Application Brief, 2021, [720007290](https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2021/fast-accurate-and-flexible-lc-pda-method-for-the-determination-of-citric-acid-in-beverages.html) <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2021/fast-accurate-and-flexible-lc-pda-method-for-the-determination-of-citric-acid-in-beverages.html>>.

ソリューション提供製品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム](https://www.waters.com/10138533) <<https://www.waters.com/10138533>>
- [ACQUITY QDa 質量検出器](https://www.waters.com/134761404) <<https://www.waters.com/134761404>>
- [Empower クロマトグラフィーデータシステム](https://www.waters.com/10190669) <<https://www.waters.com/10190669>>

720007289JA、2021 年 8 月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.