



Poroshell 120 PFP カラムと Agilent 6460 ESI トリプル四重極型 LC/MS を用いた水溶性ビタミン類の分析



Key Words: 水溶性ビタミン、一斉分析、LC/MS/MS

<要旨>

本法では非常に極性が高く ODS カラムでは保持しづらい水溶性ビタミン類の一斉分析を紹介します。ペンタフルオロフェニル(PFP) カラムを用いることで各種ビタミンを良好に分離することが可能となりました。また検出器に高い選択性を有する Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を用いることで食品サンプルのような夾雑物が多いサンプルに対応できるメソッドを確立しました。

1. はじめに

水溶性ビタミンには非常に極性が高く ODS カラムでは保持されない成分や UV 吸収を持たない成分が存在します。これまではポストカラム誘導体化法による個別分析や、イオンペア試薬を用いた逆相クロマトグラフィーが行われてきました。しかしこれらの分析法は成分毎に分析条件が異なること、また専用機が必要であることから分析に非常に手間と時間を要します。そこで今回はポストカラム誘導体化法やイオンペア逆相クロマトグラフィーを行わずに、簡便に水溶性ビタミンを一斉分析する条件を検討しました。

固定相にペンタフルオロフェニル(PFP)基を導入したカラムを用い、移動相の pH を最適化することで、極めて水溶性が高いビタミン類についても良好に保持・分離することが可能となりました。検出器には選択性の高いトリプル四重極 LC/MS を使用し、夾雑物が多い試料における高感度分析が可能となります。本法では水溶性ビタミン一斉分析法の詳細と実試料の分析例を紹介します。

2. 装置及び測定条件

主な分析条件を Table 1 に、ダイナミック MRM (dMRM) の MS 条件を Table 2 に示しました。尚イオンソースはシースガスを用いない標準 ESI イオンソース(G1946-65338)を使用しました。

Table 1 LC/MS 分析条件 (水溶性・脂溶性ビタミン共通)

LC

装置	: Agilent 1260 Infinity LC
カラム	: InfinityLab Poroshell 120 PFP (2.1x150 mm, 2.7 µm) 製品番号 (693775-408)
カラム温度	: 45° C
移動相A	: 0.2%酢酸添加10 mM酢酸アンモニウム水溶液 (pH4.1)
移動相B	: 0.1%ギ酸添加5 mMギ酸アンモニウムメタノール溶液
流速	: 0.3 mL/min
グラジエント条件	: 右図に記載
注入量	: 1 µL
平衡化時間	: 8分

min	%A	%B
0	100	0
3	100	0
3.5	35	65
10	2	98
18	2	98

MS

装置	: Agilent6460トリプル四重極LC/MS
分析モード	: ダイナミックMRM(dMRM)モード
イオン化法	: ESI (G1946-65338)
極性	: ポジティブ&ネガティブ
乾燥ガス	: 300° C, 10 L/min
ネプライザ圧力	: 45 psi
キャピラリ電圧	: 2500V (+/-)

Table 2 MRM 条件

化合物名	略称	RT	極性	Frag	定量イオン		定性イオン	
					トランジション	CE	トランジション	CE
コリン		1.22	Positive	82	104.1 → 60.2	17	104.1 → 45.2	21
カルニチン		1.29	Positive	82	162.1 → 103.0	17	162.1 → 60.2	17
ニコチン酸	B3	2.35	Positive	121	124.0 → 80.1	21	124.0 → 78.1	25
ピリドキシン	B6	2.65	Positive	82	170.1 → 152.0	9	170.1 → 134.0	21
チアミン	B1	2.67	Positive	82	265.1 → 122.0	9	265.1 → 81.1	33
ニコチンアミド	B3	4.31	Positive	121	123.1 → 80.1	21	123.1 → 53.2	33
パントテン酸	B5	5.46	Positive	82	220.1 → 90.1	9	220.1 → 202.0	8
葉酸 (negative)	B9	6.12	Negative	160	440.1 → 311.1	26	440.1 → 175.0	40
葉酸	B9	6.12	Positive	82	442.2 → 295.0	9	442.2 → 120.0	40
シアノコバラミン	B12	6.20	Positive	160	678.3 → 147.0	37	678.3 → 359.1	25
ピオチン	B7	6.27	Positive	82	245.1 → 227.0	9	245.1 → 97.0	29
リボフラビン	B2	6.28	Positive	160	377.2 → 243.0	21	377.2 → 172.0	44

※表中略語 Frag…Fragmentor CE…Collision Energy



Agilent Technologies

3. 結果および考察

Fig.1 に水溶性ビタミン標準品の MRM クロマトグラムを示しました。今回確立した条件により 11 種類の水溶性ビタミンの一斉分析が可能となりました。また Table 3 に各化合物の検量線の濃度範囲、決定係数を示しました。

Table 3 水溶性ビタミン標準液測定結果

	化合物名	略称	直線性範囲	決定係数
1	コリン		0.5-100	0.999
2	カルニチン		1-100	0.999
3	ニコチン酸	B3	1-50	0.998
4	ピリドキシン	B6	1-200	0.999
5	チアミン	B1	0.5-500	0.999
6	ニコチンアミド	B3	5-100	0.999
7	パントテン酸	B5	2-500	0.999
8	シアノコバラミン	B12	2-500	0.999
9	葉酸 (positive)	B9	2-200	0.999
10	ビオチン	B7	5-200	0.999
11	リボフラビン	B2	1-100	0.999

単位: $\mu\text{g/L}$

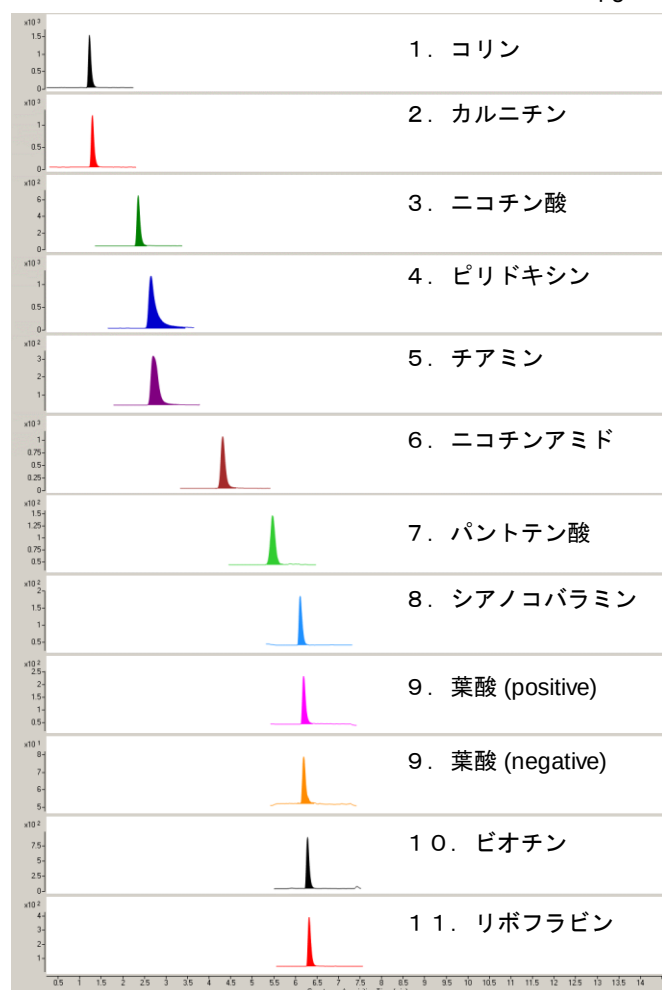


Fig. 1 水溶性ビタミン標準液 (100 $\mu\text{g/L}$) の MRM クロマトグラム

実試料分析例として、果汁10%未満の栄養機能食品であるビタミンドリンクを分析しました。試料は0.22 μm のフィルター処理した後に、超純水で100倍希釈し、得られたMRMクロマトグラムをFig.2に示しました。高い選択性を有するトリプル四重極LC/MSを用いることで、ビタミンドリンクは希釈のみで高感度に測定することが可能となりました。

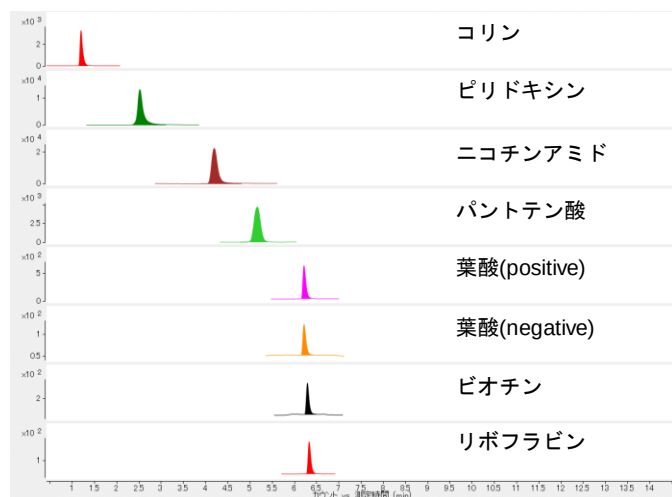


Fig. 2 ビタミンドリンクの MRM クロマトグラム

4. まとめ

Poroshell 120 PFP カラムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を用いることで水溶性ビタミンの一斉分析が可能となりました。実試料としてビタミンドリンクを分析したところ、簡便な希釈のみで水溶性ビタミンの各成分は良好に分離・検出されました。

本法で確立した分析条件は脂溶性ビタミンの一斉分析にも適用可能です。詳しくは【LC-MS-201612TA-002】をご参照ください。

【LC-MS-201612TA-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies