



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



Key Words: 脂溶性ビタミン、一斉分析、LC/MS/MS

1. はじめに

脂溶性ビタミンの分析には、これまで順相分析が広く用いられてきました。この順相分析では、ヘキサンやクロロホルムのような毒性が強い無極性溶媒を使用しなければならないことや、脂溶性ビタミンの種類によっては使用する溶媒（アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ヘキサンなど）を変更しなければならないという問題がありました。また、ODS カラムを用いた逆相分析では、カロテン類やビタミン A などの低極性化合物の保持が強くと、メタノールやアセトニトリルでは溶出しなため、テトラヒドロフランのような溶出力の強い移動相が必要になるというケースも存在します。

今回は脂溶性ビタミンの一斉分析を可能とするため、固定相にペンタフルオロフェニル基を導入した PFP カラムを使用して分析しました。PFP カラムは ODS カラムと比較すると相対的に保持が小さく、メタノールなど一般的に逆相 HPLC で使用される移動相で、脂溶性ビタミンを短時間に全て溶出させることが可能であることが期待できます。検出器には選択性の高いトリプル四重極 LC/MS を使用し、夾雑物質が多い試料における高感度分析に対応することを目的としました。本法では脂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。

<要旨>

本法では脂溶性ビタミンの一斉分析を紹介いたします。これまで各成分を別々に分析してたビタミン分析において、ペンタフルオロフェニル(PFP)カラムを用いることで脂溶性ビタミンの一斉分析が可能となりました。各成分の分離・直線性は良好で、ビタミンドリンク中の脂溶性ビタミンも希釈のみで測定することが可能となりました。

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)の条件を Table 2 に示しました。尚、LC 条件は【LC-MS-201612TA-001】で記載された水溶性ビタミン類分析と共通であり、脂溶性ビタミン分析のみ場合はグラジエント条件を変更し、分析時間の短縮が可能です。さらにトコフェロールの異性体を分離するにはグラジエント勾配を緩やかにするだけで良好な分離を得ることが可能です。(Fig.3)

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		
キャピラリー電圧	: 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	
					Transition	CE	Transition	CE
レチノール酢酸エステル	A	11.00	Positive	121	269.0 → 93.1	17	269.0 → 91.1	40
エルゴカルシフェロール	D2	11.28	Positive	121	397.4 → 69.2	29	397.4 → 379.3	5
コレカルシフェロール	D3	11.32	Positive	121	385.4 → 259.2	9	385.4 → 367.3	5
δ-トコフェロール	E	11.79	Positive	121	403.4 → 136.9	17	403.4 → 69.0	40
β-トコフェロール	E	11.95	Positive	121	417.4 → 151.0	17	417.4 → 69.0	40
γ-トコフェロール	E	12.04	Positive	121	417.4 → 150.9	17	417.4 → 69.0	40
メナキノン-4	K2	12.19	Positive	160	445.3 → 81.1	40	445.3 → 187.0	17
α-トコフェロール	E	12.19	Positive	160	431.4 → 165.0	17	431.4 → 69.2	40
トコフェロール酢酸エステル	E	12.49	Positive	200	473.4 → 207.0	17	473.4 → 165.0	40
フィトナジオン	K1	12.20	Positive	160	451.4 → 187.0	25	451.4 → 57.2	40
β-カロテン	Pro A	12.80	Positive	160	537.5 → 445.3	15	537.5 → 177.1	15

※表中略語 Frag…Fragmentor CE…Collision Energy

3. 結果および考察

Fig. 1に脂溶性ビタミン標準品のMRMクロマトグラムを示し、Table 3に各成分の保持時間、検量線の濃度範囲と決定係数を示しました。今回確立した分析条件により、12種類の脂溶性ビタミンの一斉分析が可能となりました。またこれら12種類の脂溶性ビタミンに関して、今回の分析条件ではエレクトロスプレーイオン化法(ESI)で検出可能であることが示されました。

Table 3 脂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	レチノール酢酸エステル	A	0.5-200	0.999
2	エルゴカルシフェロール	D2	1-1000	0.999
3	コレカルシフェロール	D3	5-1000	0.999
4	δ-トコフェロール	E	5-500	0.999
5	β-トコフェロール	E	2-500	0.999
6	γ-トコフェロール	E	2-1000	0.999
7	メナキノン-4	K2	2-200	0.999
8	α-トコフェロール	E	1-50	0.999
9	トコフェロール酢酸エステル	E	1-200	0.999
10	フィトナジオン	K1	1-100	0.999
11	β-カロテン	ProA	0.5-100	0.999

単位：μg/L



Fig. 1 脂溶性ビタミン標準液 (100 μg/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 のフィルターで処理後、メタノールで 10 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。結果、実試料においても希釈のみで脂溶性ビタミンを簡便に測定できることが示されました。

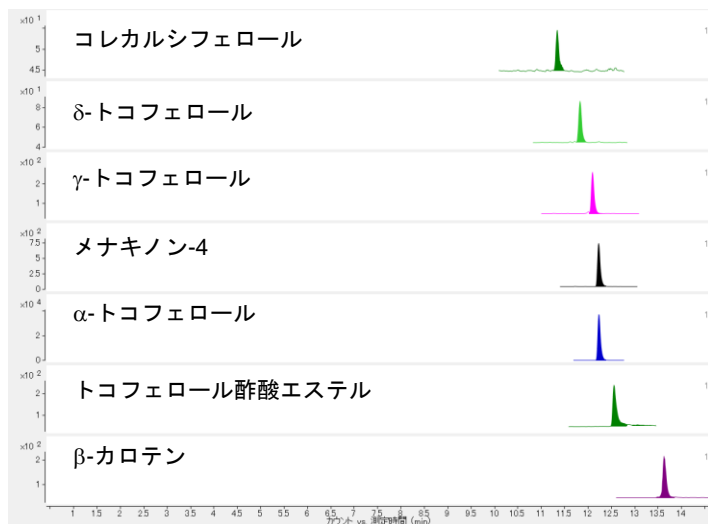


Fig. 2 ビタミンドリンク MRM クロマトグラム

4. トコフェロール異性体分離メソッド

特にトコフェロールの異性体を分離測定する場合は、下記の通りグラジエント条件を変更するだけで、良好な異性体分離が得られます。

変更前

変更後

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



min	%A	%B
0	100	0
3	100	0
3.5	35	65
20	2	98
25	2	98

グラジエント条件変更前と変更後の標準液 500 $\mu\text{g/L}$ のクロマトグラム比較を Fig.3 に示しました。β-トコフェロールとγ-トコフェロールが良好に分離されました。

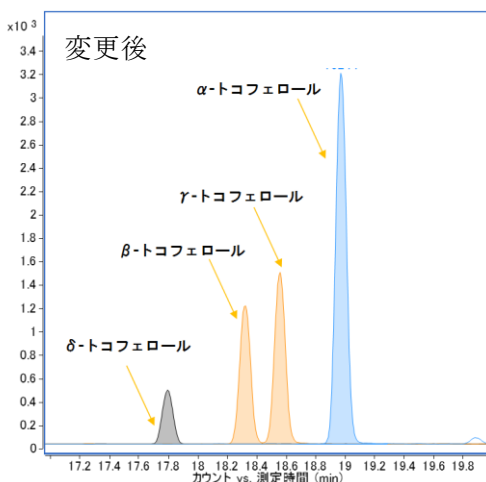
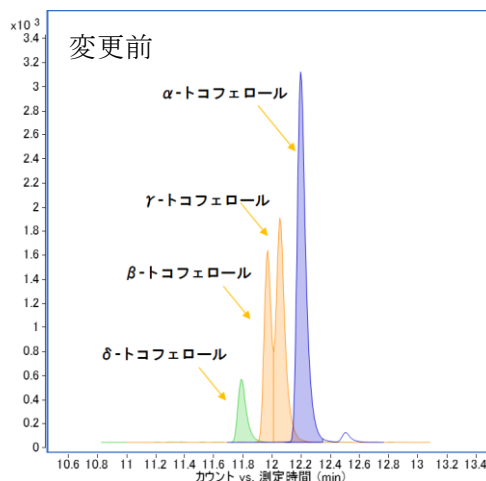


Fig. 3 グラジエント条件変更によるトコフェロール異性体分離の比較

5. まとめ

Poroshell 120 PFP カラムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を用いることで脂溶性ビタミンを一斉分析すること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、簡便な希釈のみで脂溶性ビタミンの各成分を良好に分離・検出することが可能となりました。またグラジエント条件変更により異性体も良好に分離されました。本法で確立した分析条件は水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-001】をご参照ください。

【LC-MS-201612TA-002】

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