



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・脂溶性ビタミン類の一斉分析

<要旨>

LC/MS/MS を用いて水溶性・脂溶性ビタミンの一斉分析を検討しました。オートサンプラのインジェクタプログラムを使用することで、極性が大きく異なる水溶性・脂溶性ビタミンの一斉分析が可能となりました。標準液の面積値再現性も 10%以内でした。また実試料としてマルチビタミンサプリメントを測定したところ、14 種類のビタミンが検出されました。



Key Words: ビタミン、インジェクタプログラム、一斉分析

1. はじめに

ビタミンは類縁体も含めると 30 種類以上存在しますが、その分析は古くから実施されており、HPLC を用いた各化合物の個別分析が広く行われています。しかし、質量分析計を用いることでビタミンの一斉分析が可能となります。これまでに水溶性ビタミンの一斉分析法^[1]、脂溶性ビタミンの一斉分析法^[2]をアプリケーションノートにて報告しております。本報ではこれら水溶性・脂溶性ビタミンの個別分析を応用した、水溶性・脂溶性ビタミンの一斉分析を紹介します。

Table 1 LC/MS/MS分析条件

LC			
装置	: Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプシステム		
カラム	: InfinityLab Poroshell 120 PFP (2.1x150 mm, 2.7µm) 製品番号 (693775-408)		
移動相 A	: 0.2%酢酸および 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液		
移動相 B	: 0.1%ギ酸および 5 mM ギ酸アンモニウム メタノール溶液		
注入量	: 2 µL (水溶性ビタミン 1 µL, 脂溶性ビタミン 1 µL) ※インジェクタプログラムプログラム使用		
流速	: 0.3 mL/min		
カラム温度	: 45° C		
平衡化時間	: 8 min		
グラジエント	: 右図		
	min	%A	%B
	0	100	0
	3	100	0
	3.5	35	65
	10	2	98
	18	2	98
MS			
装置	: Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム		
イオン化	: ESI (ポジティブ)		
ドライガス設定	: 300°C, 10 L/min		
ネブライザ圧力	: 45 psi		

2. 装置及び測定条件

装置および主な測定条件を Table 1 に、MRM トランジションと MS パラメータを Table 2 に示しました。

Table 2 MRMトランジションとMSパラメータ

化合物名	略称	極性	Frag	Transition	CE
コリン		Positive	82	104.1-> 60.2	17
カルニチン		Positive	82	162.1-> 103.0	17
ニコチン酸	VB3	Positive	121	124.0-> 80.1	21
ピリドキシン	VB6	Positive	82	170.1-> 152.0	9
チアミン	VB1	Positive	82	265.1-> 122.0	9
ニコチンアミド	VB3	Positive	121	123.1-> 80.1	21
パントテン酸	VB5	Positive	82	220.1-> 90.1	9
葉酸	VB9	Positive	82	442.2-> 295.0	9
シアノコバラミン	VB12	Positive	160	678.3-> 147.0	37
ビオチン	VB7	Positive	82	245.1-> 227.0	9
リボフラビン	VB2	Positive	160	377.2-> 243.0	21
レチノール酢酸エステル	VA	Positive	121	269.0-> 93.1	17
エルゴカルシフェロール	VD2	Positive	121	397.4-> 69.2	29
コレカルシフェロール	VD3	Positive	121	385.4-> 259.2	9
アスタキサンチン		Positive	160	597.4-> 147.0	25
メナキノン-4	VK2	Positive	160	445.3-> 81.1	40
トコフェロール酢酸エステル	VE	Positive	200	473.4-> 207.0	17
フィトナジオン	VK1	Positive	160	451.4-> 187.0	25
β-カロテン	Pro VA	Positive	160	537.5-> 445.3	15

※ Frag=Fragmentor voltage, ※※CE=Collision energy

水溶性と脂溶性ビタミンは大きく極性が異なるため、分析時には試料注入法が重要になります。本法では超純水で水溶性ビタミン混合標準液を、メタノールで脂溶性ビタミン混合標準液を希釈し、別々のバイアルで調製しました。次にオートサンプラのインジェクタプログラム (注入プログラム) を使用して水溶性ビ



タミンバイアルから分析開始時に 1 μL 注入し、移動相の有機溶媒比率が上昇した 5 分後に脂溶性ビタミンバイアルから 1 μL 追加注入いたしました。プログラムの詳細を Table 3 に示しました。

分析開始時に水溶性と脂溶性のビタミンを同時に注入すると水溶性ビタミンのピーク形状が著しく悪化します。また 50%メタノールのように水溶性・脂溶性ビタミンが共に溶解する溶媒を選択した場合、脂溶性ビタミンが不安定となり、オートサンプラ内で経時的に分解していきます。以上の理由より、オートサンプラのインジェクタプログラムを使用した本法が有用となります。

Table 3 オートサンプラインジェクタプログラム設定画面

操作	詳細
吸引	水溶性ビタミンバイアルから1 μL
洗浄	フラッシュポートにて10秒
注入	水溶性ビタミン注入により分析開始
待機	5 min
吸引	脂溶性ビタミンバイアルから1 μL
洗浄	フラッシュポートにて10秒
注入	脂溶性ビタミン追加注入

3. 結果および考察

Fig.1に標準液の各化合物MRMクロマトグラムを示しました。Fig.1に示したように、すべてのビタミンのピーク形状が良好であり、14分の分析時間で水溶性ビタミンは11種類、脂溶性ビタミンは8種類の一斉分析が可能となりました。

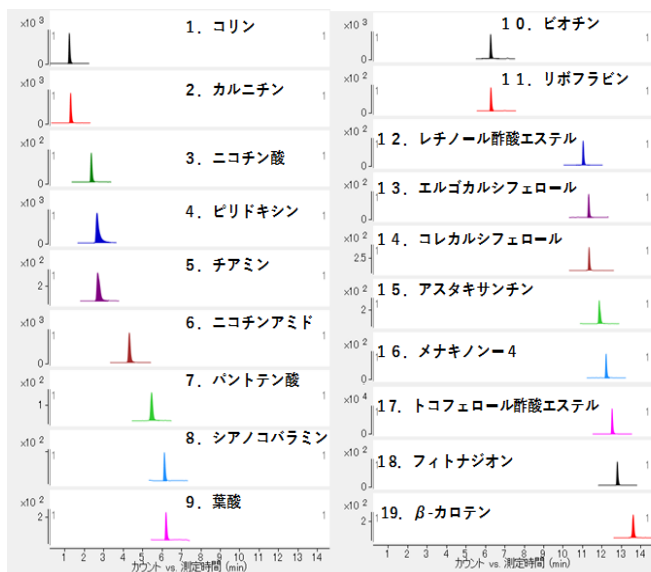


Fig.1 水溶性・脂溶性ビタミン一斉分析各化合物MRMクロマトグラム

また追加注入（インジェクタプログラム）が分析結果に与える影響を検討するため、水溶性・脂溶性ビタミンの個別分析時（インジェクタプログラム未使用）と、一斉分析時（インジェクタプログラム使用）の保持時間（RT）ならびに面積値を比較しました。各MRMクロマトグラムの重ね合わせ結果をFig.2に示し、保持時間と面積値の数値をTable 4に示しました。個別分析と一斉分析時の保持時間の差（ ΔRT ）は0.05 min以下となり、面積値についても顕著な違いはありませんでした。よってインジェクタプログラムを使用した一斉分析結果は、個別分析の結果と顕著な差がないこと示されました。

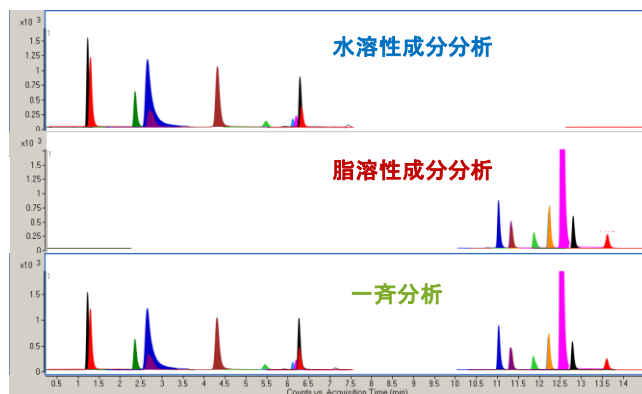


Fig.2 個別分析と一斉分析のクロマトグラム比較

上段：水溶性ビタミンの個別分析
 中段：脂溶性ビタミンの個別分析
 下段：水溶性・脂溶性ビタミンの一斉分析
 （インジェクタプログラムを使用）
 水溶性ビタミン0分注入+脂溶性ビタミン5分注入

Table 4 個別分析と一斉分析の保持時間・面積値比較

化合物名	RT			面積値	
	個別分析	一斉分析	ΔRT	個別分析	一斉分析
1コリン	1.22	1.22	0	6439	6479
2カルニチン	1.29	1.29	0	5200	5205
3ニコチン酸	2.35	2.35	0	3128	3093
4ピリドキシン	2.65	2.65	0	12759	12853
5チアミン	2.68	2.67	0.01	3028	3015
6ニコチンアミド	4.31	4.31	0	7242	7265
7パントテン酸	5.47	5.46	0.01	815	783
8シアノコバラミン	6.11	6.12	-0.01	706	708
9葉酸	6.19	6.20	-0.01	996	1062
10ビオチン	6.28	6.27	0.01	3767	4330
11リボフラビン	6.32	6.28	0.04	1531	1940
12レチノール酢酸エステル	11.00	11.03	-0.03	3466	3500
13エルゴカルシフェロール	11.30	11.31	-0.01	1989	1974
14コレカルシフェロール	11.32	11.33	-0.01	1636	1622
15アスタキサンチン	11.85	11.85	0	1474	1462
16メナキノン-4	12.20	12.21	-0.01	2697	2662
17トコフェロール酢酸エステル	12.51	12.52	-0.01	49636	48438
18フィトナジオン	12.78	12.78	0	2443	2376
19 β -カロテン	13.60	13.60	0	1247	1219

（※水溶性ビタミン=水色、脂溶性ビタミン=黄色）

各データは n=6 の平均値を掲載）

水溶性・脂溶性ビタミン一斉分析の標準液測定結果まとめを Table 5 に示しました。直線性範囲は 2 桁以上、決定係数は 0.999 以上、標準液の繰り返し面積再現性(n=6)も全化合物 10%以内となりました。

Table 5 水溶性・脂溶性ビタミン測定結果まとめ

	化合物名	RT	直線性範囲	決定係数	100 µg/L標準液 %RSD
1	コリン	1.22	1-100	0.999	1.5
2	カルニチン	1.29	1-100	0.999	1.1
3	ニコチン酸	2.35	1-100	0.998	7.0
4	ピリドキシン	2.65	1-1000	0.999	1.4
5	チアミン	2.67	5-500	0.998	3.7
6	ニコチンアミド	4.31	1-200	0.998	3.1
7	パントテン酸	5.46	1-200	0.999	8.2
8	シアノコバラミン	6.12	1-100	0.999	4.0
9	葉酸	6.20	1-100	0.999	7.8
10	ビオチン	6.27	5-200	0.999	3.2
11	リボフラビン	6.28	1-200	0.999	3.2
12	レチノール酢酸エステル	11.03	2-1000	0.999	1.4
13	エルゴカルシフェロール	11.31	5-500	0.999	1.7
14	コレカルシフェロール	11.33	5-1000	0.999	1.5
15	アスタキサンチン	11.85	5-1000	0.999	1.1
16	メナキノン-4	12.21	1-100	0.999	1.2
17	トコフェロール酢酸エステル	12.52	2-200	0.999	0.4
18	フィトナジオン	12.78	2-200	0.999	1.4
19	β-カロテン	13.60	1-100	0.999	8.1

実試料の例としてマルチビタミンサプリメントの測定を行いました。前処理の模式図を Fig.3 に、詳細の前処理法を Fig.4 に記載しました。これによりサプリメント中の水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンを別々のバイアルに分離抽出することが可能です。また前処理による抽出率を補正するため、本法では水溶性ビタミンにはニコチン酸、脂溶性ビタミンにはアスタキサンチンを内部標準として用いました。より正確な定量値算出には、各化合物の安定同位体を使用すること推奨します。

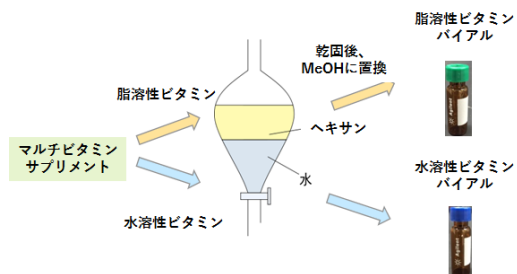


Fig. 3 マルチビタミンサプリメント前処理（模式図）

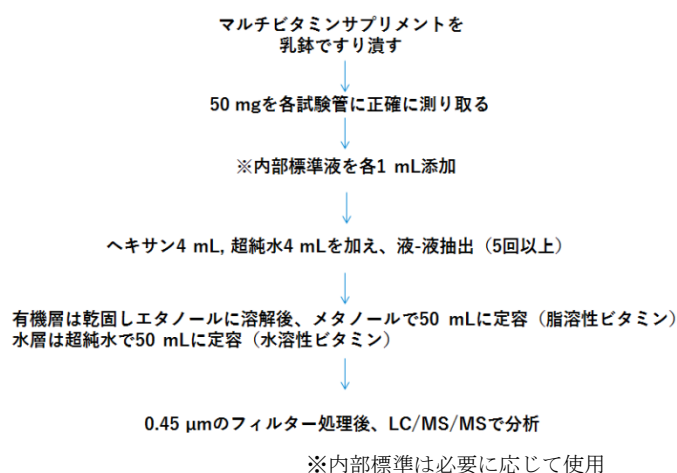


Fig. 4 マルチビタミンサプリメント前処理（詳細）

得られたマルチビタミンサプリメントの MRM クロマトグラムを Fig 5 に示しました。サプリメント中には水溶性ビタミンが 9 種類、脂溶性ビタミンが 5 種類検出され、各化合物の分離は良好でした。



Fig. 5 マルチビタミンサプリメントのMRMクロマトグラム

4. まとめ

オートサンブラのインジェクタプログラムを使用することで、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンの一斉分析が可能となりました。本法によりマルチビタミンサプリメントや野菜ジュースなど、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンを共に含む試料において、一度の分析で含有するビタミンの量を網羅的に把握することが可能となります。本メソッドはメタボロミクスの分野にも応用可能です。

参考文献

- [1] “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の分析”【LC-MS-201612TA-001】
- [2] “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の分析”【LC-MS-201612TA-002】

【LC-MS-201712TA-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