

Captiva EMR-Lipid および Bond Elut Lipid Extraction による脂溶性ビタミンの回収率比較



Authors

山下 和之

澤田 有司

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

アジレントでは脂質のクリーンアップ、回収を目的とした Bond Elut Lipid Extraction と脂質除去を目的とした Captiva EMR-Lipid の 2 種類の脂質を保持する固相抽出製品を販売しています。本アプリケーションではこれら 2 種の製品を使用して脂溶性ビタミンの回収率を検討しました。その結果、両製品で脂溶性ビタミンの挙動の違いはなく、通過するもの、保持されるもの、部分的に保持されるものがあることがわかりました。

Key words: 脂溶性ビタミン、固相抽出、LC-MS

はじめに

Bond Elut Lipid Extractionは試料中の脂質を保持させてクリーンアップし、回収することを目的とした固相抽出製品です。Captiva EMR-Lipid は脂質を含む試料液を通過させることにより脂質を除去することを目的とした固相抽出製品です。いずれもEnhanced Matrix Removal (EMR)-Lipid 充填剤技術を採用した脂質を選択的かつ効率的に保持する充填剤を充填しています。この充填剤は長鎖をもった脂質類については選択的に保持することが確認されており、ビタミンD代謝物は保持しないことが確認されています¹⁾が、代謝物ではない脂溶性ビタミン類についてはその挙動がまだ確認されていません。本アプリケーションでは脂溶性ビタミンの標準品を使用しBond Elut Lipid Extractionと容量の大きい3 mLサイズのCaptiva EMR-Lipidでその挙動を調査しました。

システム

表1. 装置構成

サンブラ	G7167B 1290 Infinity II マルチサンブラ
ポンプ	G7120A 1290 Infinity II ハイスピードポンプ
カラム恒温槽	G7116B 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット
検出器	G6470B トリプル四重極LC/MSシステム

分析条件

1. 試料調製

脂溶性ビタミンの標準品は以下のものを使用しました。
酢酸レチノール(ビタミンA): LKT-Lab製 P/N R1878-1
コレカルシフェロール(ビタミンD3): 富士フィルム和光純薬製 P/N 220-00363
 α -トコフェロール(ビタミンE): 富士フィルム和光純薬製 P/N 209-01791
メナキノン-4(ビタミンK2): 富士フィルム和光純薬製 P/N 136-16641
フィロキノン(ビタミンK1): 富士フィルム和光純薬製 P/N 221-00371
 β -カロテン(ビタミンA前駆体): 富士フィルム和光純薬製 P/N 035-05531
溶媒は以下のものを使用しました。
アセトニトリル: 関東化学社製 LC/MS用 (P/N01033-79)
メタノール: 富士フィルム和光純薬者製 LC/MS用 (P/N138-14521)
クロロホルム: 関東化学社製 HPLC用(P/N07278-1B)

ブタノール: 関東化学社製 HPLC用(P/N04354-1B)
メチル-tert-ブチルエーテル(MTBE): 東京化成工業社製(P/N B0991)
上記標準品のうち β -カロテン以外はそれぞれを1mg/mLのアセトニトリル溶液とし、 β -カロテンは1mg/mLのMTBE溶液とし、それらを合わせてアセトニトリルで希釈することで各成分が1 μ g/mL含有するアセトニトリル溶液を調製し、脂溶性ビタミンの原液としました。
Bond Elut Lipid ExtractionとCaptiva EMR-Lipidに脂質を保持させるには水を20%以上含む溶媒を使用する必要があることから、原液:アセトニトリル:超純水を2:6:2の比率で混合した各ビタミン200 ng/mLとなる溶液を固相抽出に負荷する試料液としました。

2. Bond Elut Lipid Extractionによる処理

試料液0.2 mLを負荷し通過する液を捕集し、0.4 mLに定容しました。(画分L1)
カラムを80%アセトニトリル水溶液1 mLで2回洗浄し、通過した液を捕集し2mLに定容しました。(画分L2)
カラムをクロロホルム/メタノール(1/1)1 mLで2回溶出し、溶出液をガラス容器に捕集し、窒素気流下で蒸発乾燥後、メタノール/ブタノール(1/1)0.4 mLで溶解しました。(画分L3)

3. Captiva EMR-Lipidによる処理

試料液2.5 mLを負荷し通過してくる液を捕集し、5 mLに定容しました。(画分C1)
カラムを80%アセトニトリル水溶液7.5 mLで洗浄し、通過した液を捕集し10 mLに定容しました。(画分C2)
カラムをクロロホルム/メタノール(1/1)7.5 mL+1 mLで溶出し、溶出液をガラス容器に捕集し、窒素気流下で蒸発乾燥後ブタノール/メタノール(1/1)5 mLで溶解しました。(画分C3)

4. LC-MSによる分析

画分L1～3とC1～3をLC-MSで分析しました。
分析条件は表2の通りです。

表2 LC-MS/MS条件

パラメーター	値			
乾燥ガス	N ₂ 、300 °C、10 L/min			
シースガス	N ₂ 、400 °C、12 L/min			
極性	ポジティブ			
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)			
イオン化モード	ESI ポジティブ			
キャピラリ電圧	3000 V			
MRM	化合物名	トランジション	¹ F	² CE
	酢酸レチノール (ビタミン A)	269 > 93.1	120	17
	コレカルシフェロール (ビタミン D3)	385.4 > 259.2	120	9
	メナキノ-4 (ビタミン K2)	445.3 > 81.1	160	40
	α-トコフェロール (ビタミン E)	431.4 > 165	160	17
	フィロキノン (ビタミン K1)	451.4 > 187	160	25
	β-カロテン (ビタミン A 前駆体)	537.5 > 445.3	160	15
カラム	InfinityLab Poroshell 120 PFP, 2.1 x 50 mm, 1.9 μm (p/n 699675-408)			
移動相	A: 0.2% (v/v) 酢酸, 10 mM 酢酸アンモニウム, 超純水			
	B: 0.1% (v/v) ギ酸, 5 mM ギ酸アンモニウム, メタノール			
流速	0.5 mL/min			
グラジエント	時間 (分)	% B		
	0	1		
	0.5	1		
	1.5	65		
	8	98		
	9	98		
	9.1	1		
	12	1		
カラム温度	45 °C			
注入量	1 μL			

¹F = Fragmentor voltage (V), ²CE = Collision energy (V)

結果および考察

1. LC/MSによる脂溶性ビタミンの分析結果

各ビタミン標準品のMRMクロマトグラムを図1に示します。高カラム効率・低背圧の表面多孔性カラムInfinityLab Poroshell 120 PFPを利用して、脂溶性ビタミンが検出できました。

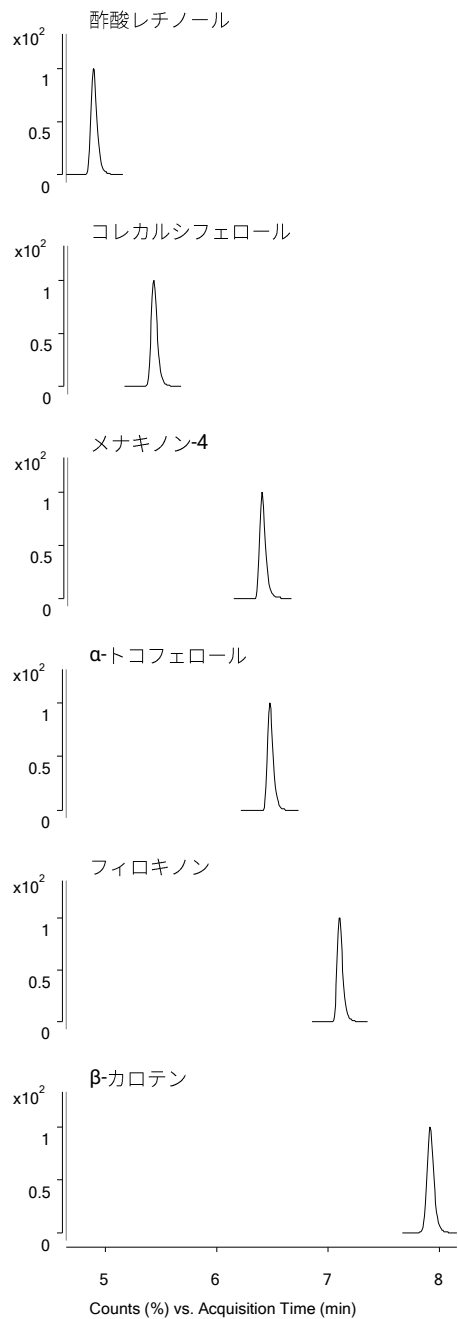


図1. 脂溶性ビタミンのMRMクロマトグラム (濃度200 µg/L)

2. 回収率

Bond Elut Lipid ExtractionおよびCaptiva EMR-Lipid 3 mLカートリッジによる各ビタミンの回収率を表3に示します。画分L1とL2およびC1とC2の合計を充填剤に保持されずに通過した通過画分、L3およびC3で回収された画分を保持画分として示します。

表3.Bond Elut Lipid Extraction およびCaptiva EMR-Lipidでの脂溶性ビタミンの回収率 (%)

化合物	Bond Elut Lipid Extraction		Captiva EMR-Lipid 3mL	
	通過画分	保持画分	通過画分	保持画分
酢酸レチノール	96.1	2.3	95.4	1.2
コレカルシフェロール	96.5	0.2	89.4	2.0
メナキノン-4	96.1	5.1	88.2	1.9
α-トコフェロール	108.1	10.0	86.8	6.1
フィロキノン	77.3	19.6	61.3	23.0
β-カロテン	4.2	89.8	1.0	93.6

酢酸レチノール、コレカルシフェロール、メナキノン-4、α-トコフェロールについてはEMR-Lipid充填剤に保持されず、通過画分に溶出されました (86.8-108.1 %)。これらの脂溶性ビタミンはEMR-Lipid充填剤を利用した前処理によって脂質類と分画できることが確認できました。β-カロテンはEMR-Lipid充填剤に保持されました (89.8ー93.6 %)。このため、β-カロテンは脂質と同じ挙動をすることが確認できました。フィロキノンは20%程度がEMR-Lipid充填剤に保持されました。構造上も長鎖の炭素鎖の部分があるためEMR-Lipid充填剤に保持される可能性が考えられ、EMR-Lipid充填剤で脂質類とは完全には分画できない可能性があります。

まとめ

このアプリケーションノートでは、脂質を選択的かつ効率的に保持する EMR 充填剤技術を採用した、Bond Elut Lipid ExtractionとCaptiva ND-Lipidを利用し、脂溶性ビタミンの挙動を調査しました。この結果、EMR充填剤に保持される (β-カロテン)、保持されない (酢酸レチノール、コレカルシフェロール、メナキノン-4、α-トコフェロール)、部分的に保持される (フィロキノン) などの脂溶性ビタミンが確認できました。これらの情報を利用すれば脂溶性ビタミンの効率的な前処理と確度の高い定量分析が可能になります。

保持されないビタミンはCaptiva EMR-Lipidにより脂質と分離して精製が可能です。保持されるビタミンはBond Elut Lipid Extractionにより精製が可能です。

参考文献

1) アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションノート 5991-7956JAJP

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, October 27, 2021

DE44495.8543402778

LC-MS-202110YSSD-002