

LC/MS/MS トリプル四重極による 14 種類の脂溶性ビタミンとカロテノイドの 一斉定量分析

著者

Hui Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを搭載した Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS に接続された Agilent 1290 Infinity II LC を使用して、栄養補助食品中の 14 種類の脂溶性ビタミンとカロテノイドを同時に測定するメソッドについて説明します。このメソッドを使用して、非常に複雑なマルチビタミン錠剤マトリックス中の脂溶性ビタミンと特定のカロテノイドを定量しました。分析した成分はすべて、表示された濃度と一致しました。本メソッドは、脂溶性ビタミンと特定のカロテノイドを含有するサプリメント製品の品質管理や栄養表示の証明に使用できることが結論付けられました。

はじめに

脂溶性ビタミンとカロテノイドにはフリーラジカル捕捉特性があり、抗酸化物質として機能します。^{1,2} 栄養における脂溶性ビタミン (A、D、E、K) とカロテノイドの重要性は広く認識されています。脂溶性ビタミンを含有するサプリメントは、ビタミンを十分に摂取するために消費されることが多く、錠剤、カプセル、グミ、ソフトジェル、ドリンクなどのさまざまな形態で提供されています。さまざまな理由から、脂溶性ビタミンとカロテノイドの正確な定量測定が必要とされています。例えば、製品品質の確保やコンプライアンスの確認、劣化の可能性の特定 (サプリメントカプセル化の処理による)、成分表示と実際の組成との比較評価などです。

脂溶性ビタミンには、遊離型とそのエステル型があります。ビタミン A とビタミン E のエステルは安定性が高いため、サプリメントで栄養価を高めるためによく使用されます。本研究では、脂溶性ビタミンのビタミン A (レチノール、レチニル酢酸エステル、レチニルパルミチン酸エステル)、ビタミン D (コレカルシフェロール (D3) およびエルゴカルシフェロール (D2))、ビタミン E (α -トコフェロール、酢酸 α -トコフェロール、コハク酸 α -トコフェロール)、ビタミン K (フィトナジオン (K1)、メナキノン (K2-4)、メナキノン (K2-7))、およびベータカロチン、ルテイン、リコピンなどの特定のカロテノイドを単一のメソッドで分析しました。脂溶性ビタミンとカロテノイドの構造を図 1 に示します。

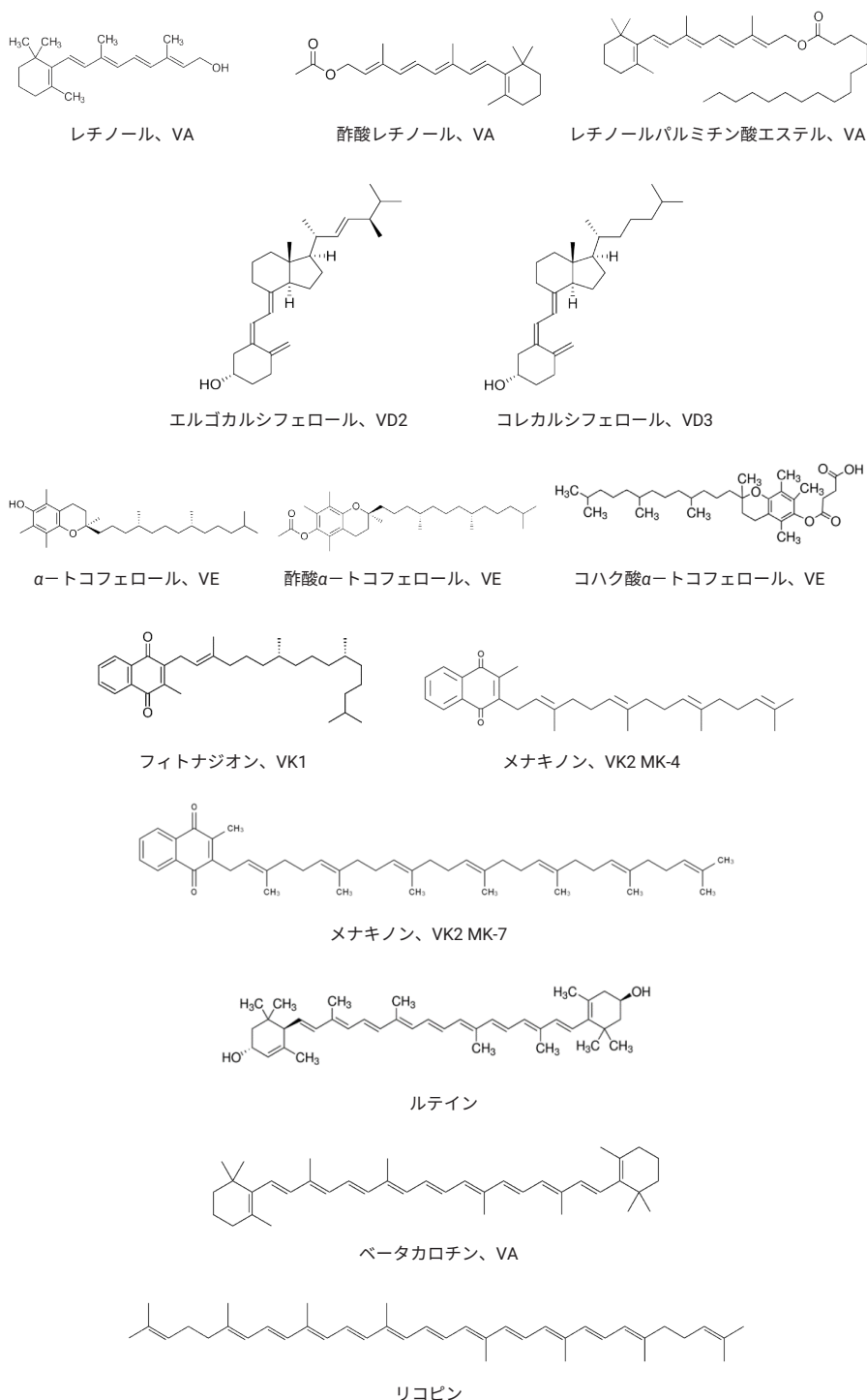


図 1. 脂溶性ビタミンの構造

従来のメソッドには、精度や特異性、スループットに重大な欠点がある微生物学的メソッドがあります。LC-UV メソッドは、低レベルのビタミン（ビタミン D や K など）に対する感度が低く、複雑なマトリックス内での選択性が低くなります。これらのメソッドでは、すべての脂溶性ビタミンとカロテノイドを定量化するために、複数の分析が必要になることがよくあります。感度、選択性、精度の問題は、トリプル四重極 MS を用いて分析することで解決できます。しかし、サプリメント中のカロテノイドと脂溶性ビタミンを同時に分析できる LC/MS/MS メソッドはほぼありません。

本研究では、独自の LC/TQ メソッドを開発・評価し、複雑なマルチビタミン錠剤マトリックス中の脂溶性ビタミンおよび特定のカロテノイドの迅速かつ高感度な同定と正確な定量を実現しました。14 種類の脂溶性ビタミンとカロテノイドをすべて、1 回の分析で同時に分析しました。マトリックス効果を補正するために、抽出後マトリックス適合標準を用いました。データ承認に関するメソッド基準を確立しました。

実験方法

機器

本研究における実験はすべて、Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS (G6470B) に接続された Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、Agilent 1290 Infinity II 高速ポンプ (G7120A)、および Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) で構成される Agilent 1290 Infinity II LC を使用して実施しました。システムの制御には、Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェア、バージョン 10.1 を使用しました。データ処理には、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア (バージョン 10.2) と MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア (バージョン 10.0) を使用しました。

クロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値			
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Stable Bond-Aqueous, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部品番号 683775-914)			
カラムオープン	45 ± 2 °C			
注入量	1 μL			
分析時間	12 分			
オートサンブラ	5 ± 2 °C			
移動相 A	0.1 % 酢酸水溶液			
移動相 B	0.1 % 酢酸メタノール溶液			
ニードル洗浄	0.1 % 酢酸アセトニトリル溶液			
グラジエント	時間 (分)	流量 (mL/分)	%A	%B
	0	0.25	20	80
	7.0	0.25	0	100
	9.5	0.25	0	100
	10.0	0.25	20	80
12.0	0.25	20	80	

MS パラメータ

パラメータ	設定値
MS 取り込み	dMRM
イオン源タイプ	Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン化 (AJS ESI positive)
ドライガス温度	250 °C
ドライガス流量	11 L/分
ネブライザ	40 psi
シースガスヒーター	350 °C
シースガス流量	12 L/分
キャピラリー	4,000 V
ノズル電圧	1,000 V
プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンの分解能	ユニット
化合物固有の条件	表 1 を参照

サンプルと標準

対象としたマトリックスは、食品ベースのブレンドを含む複雑なマルチビタミン錠剤です。レチノール、レチニル酢酸エステル、レチニルパルミチン酸エステル、コレカルシフェロール、エルゴカルシフェロール、α-トコフェロール、酢酸α-トコフェロール、コハク酸α-トコフェロール、フィトナジオン、メナキノン (K2-4)、メナキノン (K2-7)、およびベータカロチンの標準は、Millipore Sigma, Inc. (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。ルテインとリコピンは Chromadex, Inc. (ロサンゼルス、カリフォルニア州、米国) から入手しました。コレカルシフェロール -D6 およびエルゴカルシフェロール -D3 溶液 (100 μg/mL) は、IsoSciences (ウエストチェスター、ペンシルベニア州、米国) から入手しました。

個々の分析対象物と内部標準原液は、エタノールで 100 μg/mL の濃度で調製し、純度を考慮しました。サンプルと標準は -20 °C で保管しました。

メソッド

サンプル前処理法

本研究で採用した最適化されたサンプル調製プロトコルの詳細な説明を以下に示します。表 1 に成分ごとの LC/MS/MS の条件を示します。

1. 分析用天秤を使用して錠剤の平均重量を測定します。サンプルを微粉末に粉碎し、均質な混合物とします。
2. サンプル 1 g を計量し、20 mL ガラスシンチレータバイアルに入れます。
3. DMSO 5 mL をバイアルに加えて 1 ~ 2 分間ボルテックスで攪拌します。
4. バイアルをウォーターバスで 50 ~ 60 °C まで 5 分間加熱します。
5. エタノール 15 mL を加えて 15 分間振とうします。
6. 約 1.5 mL のサンプル抽出物を 2 mL マイクロ遠心チューブに吸い込みます。
7. サンプル抽出物を 13,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
8. 必要に応じて、上澄みをエタノールで希釈します。
9. 希釈したサンプルと一緒にポストスパイクしたサンプルを調製します。
10. 分析用のポジティブ ESI モードを使用して LC/MS/MS にサンプルを注入します。

メソッド評価の手順

メソッドの性能は、複雑なマルチビタミン錠剤サンプルを分析することによって評価しました。定量は、1/x 重み付けによる同位体標識された内部検量線、または 1/x 重み付けおよび単一点ポストマトリックススパイク補正による外部検量線を使用して実施しました。

表 1. 分析対象物固有の LC/MS 条件：プレカーサからプロダクトイオンへのトランジション、フラグメンター、コリジョンエネルギー (CE)、セル加速電圧 (CAV)、およびリテンションタイム (RT)

化合物グループ	化合物名	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	RT (分)	デルタ RT (分)	フラグメンター (V)	CE (V)	CAV (V)
カロテノイド、VA	ベータカロチン	537.5	445.1	8.60	1.5	144	12	5
カロテノイド、VA	ベータカロチン	537.5	104.8	8.60	1.5	144	68	5
カロテノイド、VA	ベータカロチン	537.5	91.0	8.60	1.5	144	80	5
カロテノイド、VA	ベータカロチン	537.5	119.2	8.59	1.5	144	52	5
カロテノイド	ルテイン	569.2	171.0	6.80	1	160	40	5
カロテノイド	ルテイン	569.2	339.1	6.80	1	160	20	5
カロテノイド	ルテイン	569.2	477.2	6.80	1	160	15	5
カロテノイド	リコピン	537.5	69.1	9.25	1.5	140	45	5
カロテノイド	リコピン	537.5	144.8	9.25	1.5	140	35	5
カロテノイド	リコピン	537.5	334.0	9.25	1.5	140	10	5
VA	レチノール	287.2	41.2	3.03	1.5	104	60	5
VA	レチノール	287.2	69.1	3.04	1.5	104	28	5
VA	レチノール	287.2	81.1	3.03	1.5	104	24	5
VA	レチノール	287.2	55.1	3.03	1.5	104	48	5
VA	酢酸レチノール	329.2	269.2	3.83	1.5	104	8	5
VA	酢酸レチノール	329.2	121.1	3.84	1.5	104	28	5
VA	酢酸レチノール	329.2	202.9	3.83	1.5	104	48	5
VA	酢酸レチノール	329.2	191.7	3.83	1.5	104	56	5
VA	レチニルパルミチン酸エステル	525.5	269.1	7.74	1	128	12	5
VA	レチニルパルミチン酸エステル	525.5	145.0	7.74	1	128	20	5
VA	レチニルパルミチン酸エステル	525.5	105.1	7.72	1	128	56	5
VA	レチニルパルミチン酸エステル	525.5	144.1	7.75	1	128	20	5
VD	コレカルシフェロール	385.1	107.1	5.33	1	104	28	5
VD	コレカルシフェロール	385.1	105.1	5.33	1	104	56	5
VD	コレカルシフェロール	385.1	81.1	5.33	1	104	44	5
VD	コレカルシフェロール	385.1	159.1	5.33	1	104	25	5
VD	コレカルシフェロール	385.1	259.1	5.33	1	104	25	5
VD	エルゴカルシフェロール	397.1	69.1	5.43	1	104	36	5
VD	エルゴカルシフェロール	397.1	107.1	5.43	1	104	28	5
VD	エルゴカルシフェロール	397.1	105.1	5.43	1	104	56	5
VD	エルゴカルシフェロール	397.1	41.2	5.43	1	104	60	5
VD	VD2 IS	400.1	69.1	5.43	1	104	40	5
VD	VD3 IS	391.1	105.0	5.32	1	128	48	5
VE	α-トコフェロール	431.4	165.1	5.60	1	128	24	5
VE	α-トコフェロール	431.4	55.1	5.60	1	128	60	5
VE	α-トコフェロール	431.4	69.1	5.60	1	128	44	5
VE	α-トコフェロール	431.4	57.1	5.60	1	128	48	5
VE	コハク酸α-トコフェロール	531.4	265.0	5.87	1.5	176	20	5

化合物グループ	化合物名	プリカー サイオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	RT (分)	デルタ RT (分)	フラグメンター (V)	CE (V)	CAV (V)
VE	コハク酸 α -トコフェ ロール	531.4	165.0	5.87	1.5	176	48	5
VE	コハク酸 α -トコフェ ロール	531.4	149.0	5.87	1.5	176	36	5
VE	酢酸 α -トコフェロール	473.4	207.1	6.47	1	172	16	5
VE	酢酸 α -トコフェロール	473.4	165.0	6.47	1	172	40	5
VE	酢酸 α -トコフェロール	473.4	137.0	6.47	1	172	60	5
VE	酢酸 α -トコフェロール	473.4	55.2	6.47	1	172	76	5
VK	メナジオン、VK3	173.1	77.0	1.89	1	104	36	5
VK	メナジオン、VK3	173.1	105.1	1.89	1	104	30	5
VK	メナジオン、VK3	173.1	145.0	1.89	1	104	15	5
VK	メナジオン、VK3	173.1	50.9	1.89	1	104	60	5
VK	メナキノン、VK2 MK-4	445.3	69.1	5.36	1	128	44	5
VK	メナキノン、VK2 MK-4	445.3	81.1	5.36	1	128	56	5
VK	メナキノン、VK2 MK-4	445.3	187.0	5.36	1	128	24	5
VK	メナキノン、VK2 MK-4	445.3	95.1	5.36	1	128	40	5
VK	メナキノン、VK2 MK-7	649.5	187.0	8.02	1	104	32	5
VK	メナキノン、VK2 MK-7	649.5	95.0	8.02	1	104	32	5
VK	メナキノン、VK2 MK-7	649.5	81.0	8.02	1	104	32	5
VK	フィトナジオン、VK1	451.4	187.0	6.45	1	128	28	5
VK	フィトナジオン、VK1	451.4	57.1	6.45	1	128	40	5
VK	フィトナジオン、VK1	451.4	43.2	6.45	1	128	60	5
VK	フィトナジオン、VK1	451.4	71.1	6.45	1	128	28	5

メソッド評価項目

特異性：

- 標準のピークの平均に対する各分析対象物のピークのリテンションタイムが、 ± 0.2 分以内である
- イオン比が 30% 以内の誤差である

直線性と範囲：

- 検量線の R^2 が >0.99 である
- 計算された作業標準値が、理論値の $\pm 30\%$ 以内である
- 標準液は、分析対象物の濃度レベルを内包する

精度：

- 各脂溶性ビタミンまたはカロテノイドの分析結果は、製品ラベルに記載されている 100% 以上を満たす (表 3 を参照)
- ポストスパイク回収率は 70 ~ 130% 以内である (メソッドと機器性能の違いにより、基準は個々のラボで決定する必要があります)

結果と考察

有機移動相の選択

本研究では、アセトニトリルとメタノールの2つの有機移動相を同じ LC 条件で評価しました。メタノールを使用した場合すべての化合物

で、同等またはより優れた感度が得られました。MeOH は ACN よりも安価であるという事実も含めて、MeOH を最終的な溶媒として選択しました。2つの溶媒の感度比較については図2を参照してください。メタノールによりイオン化が強化されるため、化合物の感度が改善します。

特異性

ビタミンの定量には、ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) 取り込みメソッドを使用しました。相対強度比と分析対象物ピークの RT を評価して MS/MS トランジションを監視することにより、定量分析における潜在的な干渉からターゲット化合物を区

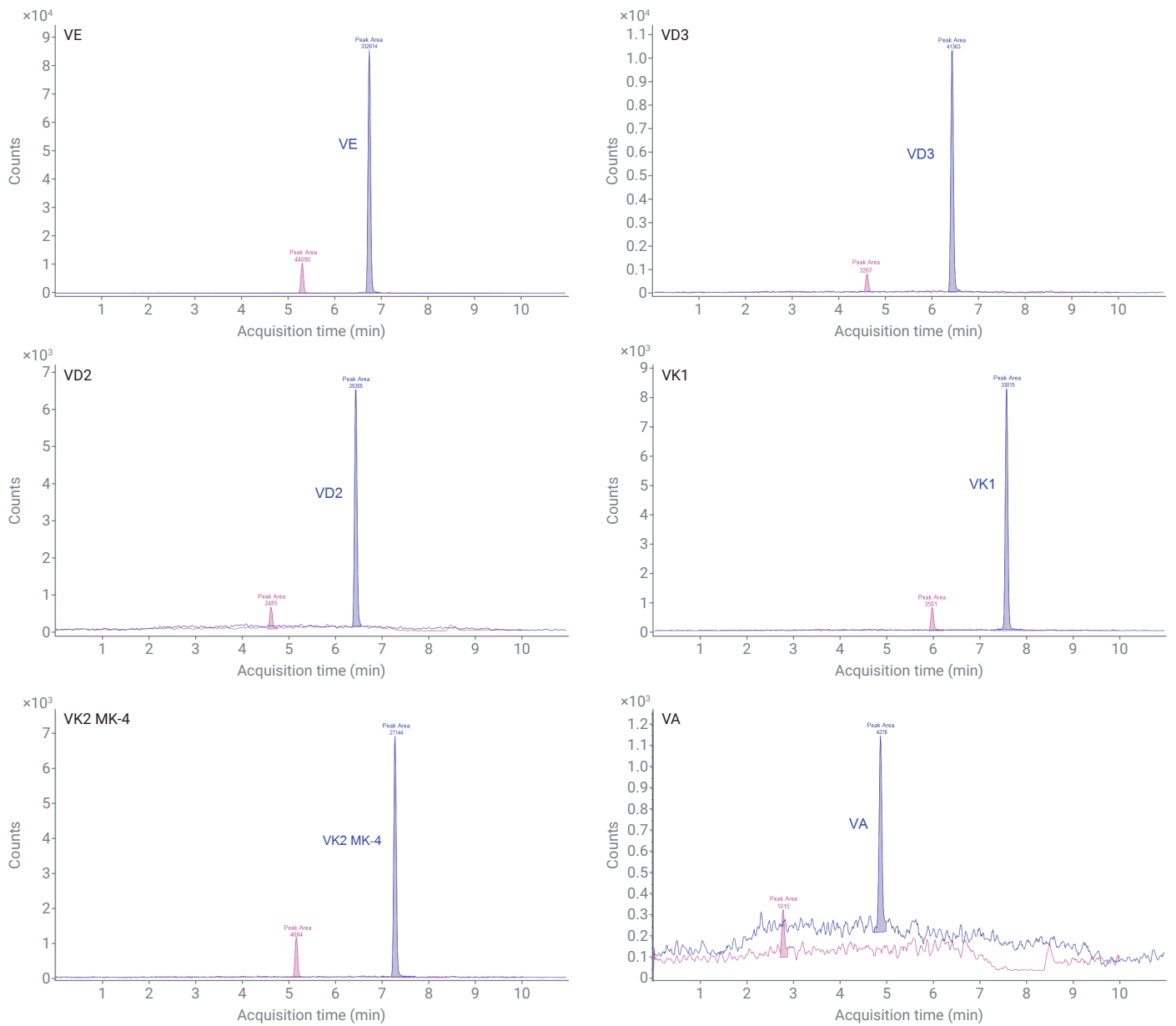


図 2. 有機移動相としてのアセトニトリルとメタノールの感度の比較。青色のピークは、移動相 B として 0.1% 酢酸メタノール溶液を使用した場合。ピンク色のピークは、移動相 B として 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液を使用した場合。移動相 A は、0.1% 酢酸水溶液

別することができます。図 3A はすべてのターゲット化合物の溶出プロファイルです。図 3B はエタノール中の作業標準 5 ng/mL の抽出イオンクロマトグラム の例です。図 4 は、エタノール中で試薬ブランクに分析対象物が含まれていないことを示しています。

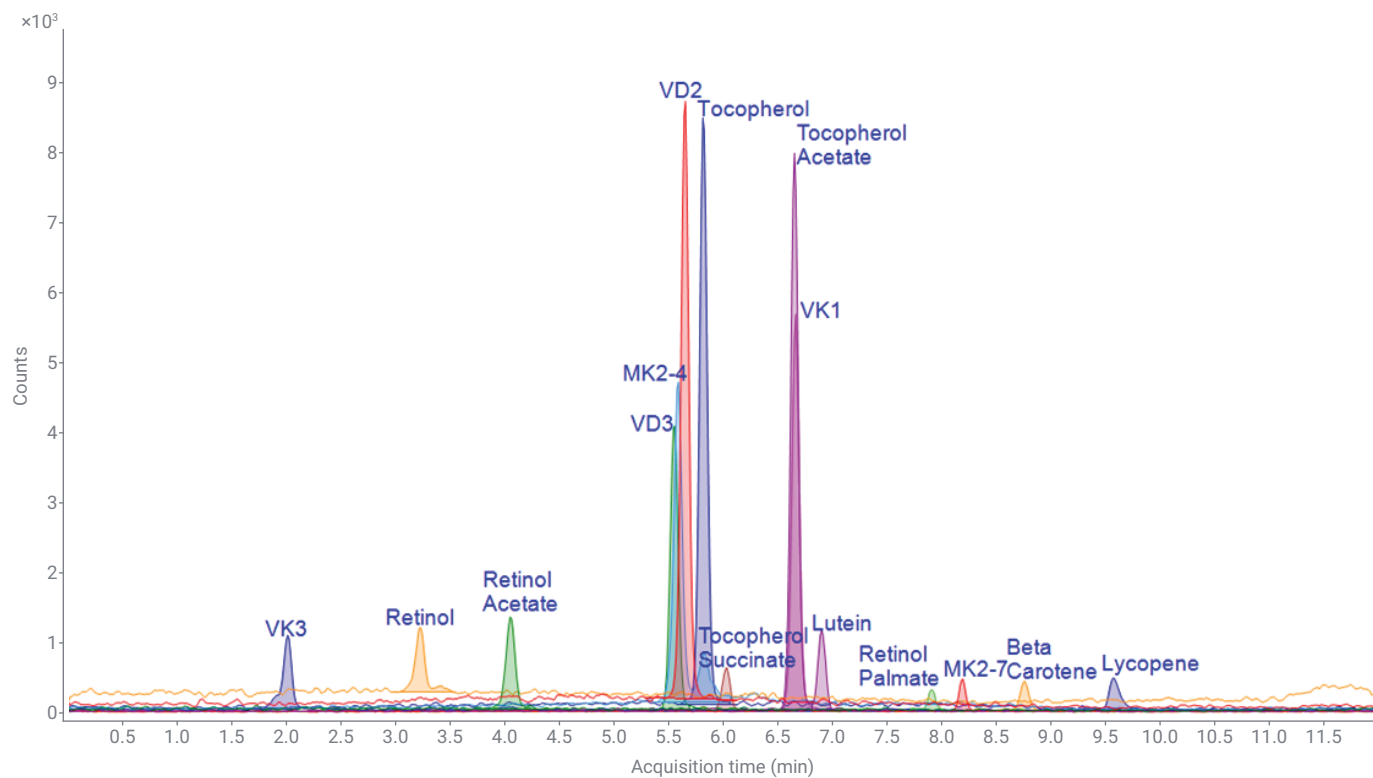


図 3A. すべての脂溶性ビタミンの溶出プロファイル

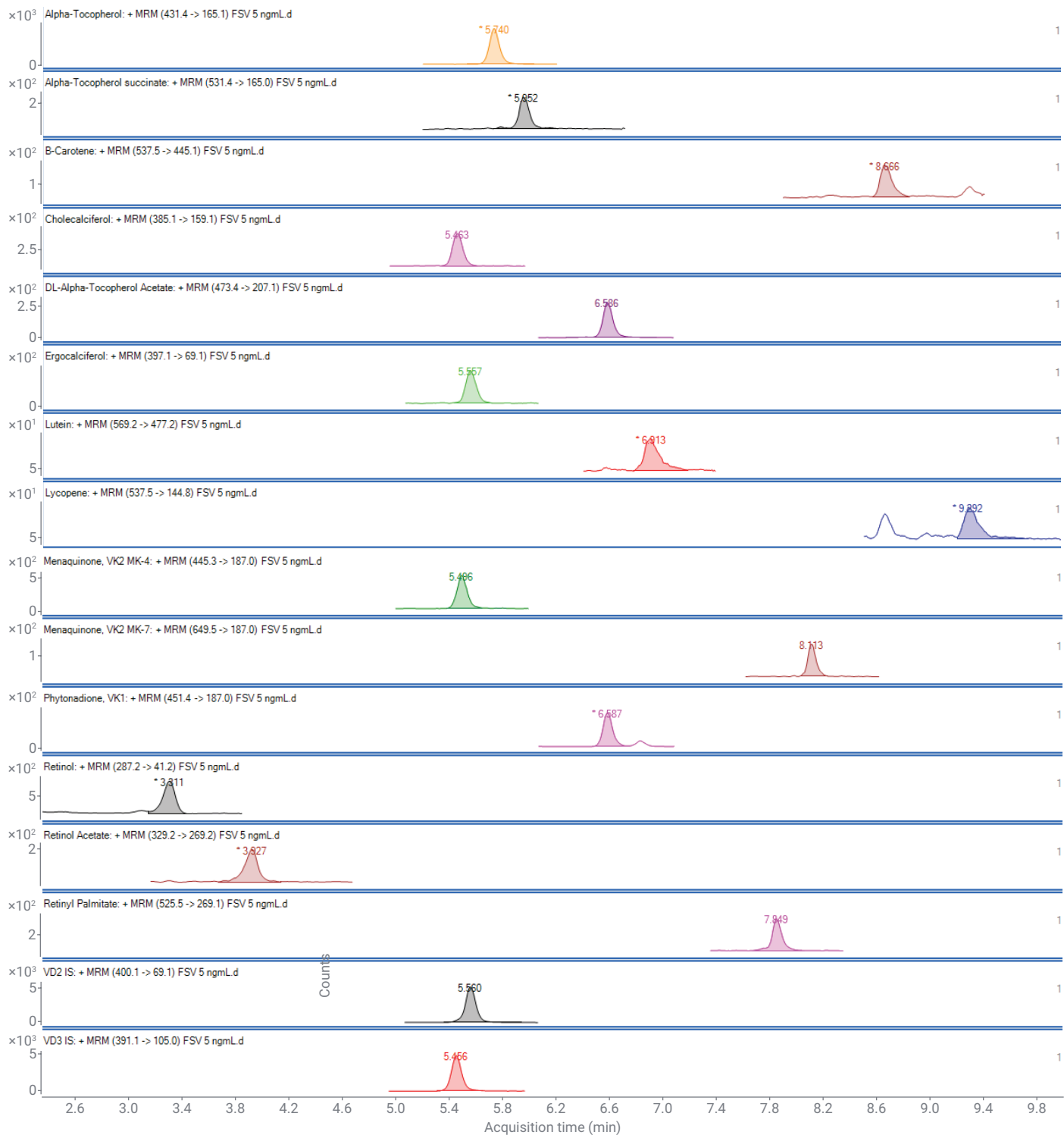


図 3B. ビタミン複合体作業標準 5 ng/mL エタノール溶液、注入量 1 μ L の抽出イオンクロマトグラム

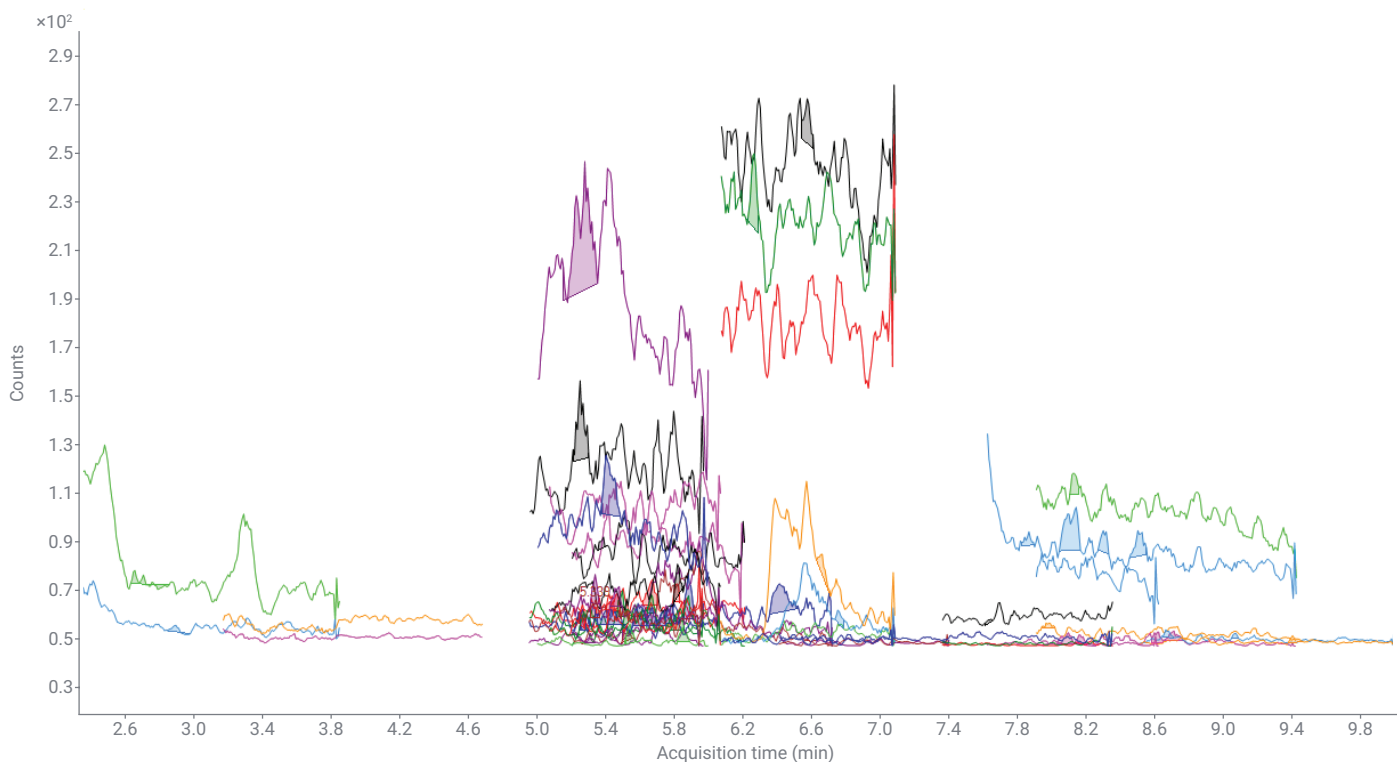


図 4. 溶媒ブランク（エタノール）の抽出イオンクロマトグラム

範囲と直線性

メソッドの評価を、0.2 ~ 500 ng/mL の範囲で実施しました。メソッドの直線性を評価するために、0.2、0.5、1、5、10、50、100、200、および 500 ng/mL の 9 つの作業標準 (WS) 溶液を作成しました。検量線の残差は、WS1 ~ WS9 で $\leq 30\%$ でした。線形性は、 $1/x$ 重み係数を使用した線形検量線を使用して決定しました。決定係数 (R^2) は >0.99 でした。表 2 に、検量線の残差および線形範囲、決定係数の統計データを示します。

表 2. 検量線の統計データ

化合物名	検量線残差、パーセント									範囲 (ng/mL)	R^2
	WS1	WS2	WS3	WS4	WS5	WS6	WS7	WS8	WS9		
	0.2	0.5	1	5	10	50	100	200	500		
α -トコフェロール	16.5	2.6	4.9	-12.5	-12.6	-11.3	-3.6	-1.6	2.9	0.2 ~ 500	0.9976
酢酸 α -トコフェロール	12.9	13.7	-5.8	0.1	-7.4	-8.6	-1.3	-4.6	2.6	0.2 ~ 500	0.9980
コハク酸 α -トコフェロール	-	4.7	3.3	-1.3	1.2	-4.2	-0.2	1.2	0.3	0.5 ~ 500	0.9996
コレカルシフェロール	-	-4.8	11.1	-3.0	6.4	-5.7	0.6	-2.3	2.1	0.5 ~ 500	0.9992
エルゴカルシフェロール	-	10.4	-1.3	1.8	-5.0	-5.0	-0.6	0.8	0.5	0.5 ~ 500	0.9998
ベータカロチン	-	-	-24.1	1.5	-2.5	7.9	5.6	6.5	-8.1	1.0 ~ 500	0.9943
ルテイン	-	-	-	-7.7	17.4	1.3	3.6	5.2	-1.4	5 ~ 500	0.9965
リコピン	-	-	-	12.2	-10.5	0.0	-6.1	3.8	0.5	5 ~ 500	0.9978
メナキノ、VK2 MK-4	-	18.9	-2.1	11.1	-2.3	-4.1	0.1	-1.1	0.5	0.5 ~ 500	0.9993
メナキノ、VK2 MK-7	-	24.7	-11.8	12.6	-2.2	-0.7	7.1	2.3	-4.5	0.5 ~ 500	0.9971
フィトナジオン、VK1	-	-20.0	-17.2	5.6	5.8	4.5	7.1	4.7	-6.8	0.5 ~ 500	0.9948
レチノール	-	-	-	-15.5	-10.9	-0.8	2.1	1.7	-7.1	5 ~ 500	0.9932
酢酸レチノール	-	-	4.2	-8.4	2.3	-1.6	-1.3	-5.8	-	1 ~ 200	0.9918
レチニルパルミチン酸 エステル	-	17.4	-18.3	3.0	-2.1	4.8	-1.6	-1.2	0.1	0.5 ~ 500	0.9936

高精度な定量へのアプローチ

マトリックス内で干渉物質が観察される場合があり、エレクトロスプレーイオン化プロセスに影響を与え、イオン抑制または強化を引き起こす可能性があります。現在、メソッドや機器性能が異なるため、ビタミンのマトリックス効果に関するガイドラインはありません。しかしマトリックス効果は補正しなければなりません。ポストスパイクされたマトリックス適合標準または標準添加は、内部標準が利用できない場合や入手が容易でない場合、定量のためのマトリックス効果またはその他のマトリックス相互作用に対処できます。³

サンプルテスト

マルチビタミン錠剤のサンプルには、果物、野菜、消化酵素、その他の植物ベースの混合物など、食品ベースの混合物が含まれています。この製剤の組成が複雑であったため、LC/MS/MSによりさまざまな脂溶性ビタミンとカロテノイドを明確に同定し、正確な定量を行い、高感度な分析が行えることを実証するための優れたマトリックスとなりました。LC/MS/MSの感度が高いため、サンプル抽出後に大幅な希釈を行うことができます。レチニル酢酸エステル、ベータカロチン、コレカルシフェロール、コハク酸 α -トコフェロール、フィトナジオンのポストスパイク回収率は許容範囲（70～130%）に収まり、結果の補正を行いました。脂溶性ビタミンの補正結果はすべ

て、製品ラベル表示の100%以上を満たしました。製剤の成分ではない残りの脂溶性ビタミンとカロテノイドもポストスパイクされ、ポストスパイク回収率はすべて許容範囲内でした。各分析対象物のサンプル結果とポストスパイク回収率を表3に示します。コレカルシフェロールの結果も、マトリックス適合補正後の結果と比較するために、内部標準を使用して補正しました。両方の結果は良好に一致しました（表3を参照）。

表 3. マルチビタミン錠剤のサンプル結果

化合物名	ビタミン	1 回量 (g)	製品ラベル表示 (mg/1 回量)	IS による補正結果 (mg/1 回量)	ポストスパイク回収率による補正結果 (mg/1 回量)	ポストスパイク回収率 (%)
レチニル酢酸エステル	A	5	0.54		0.60	87.8
ベータカロチン	A、カロテノイド	5	1.26		1.85	103
コレカルシフェロール	D3	5	0.05	0.08	0.078	97.1
コハク酸 α -トコフェロール	E	5	60		87	106
フィトナジオン	K1	5	0.12		0.18	106
レチノール	A	5				86.6
レチニルパルミチン酸エステル	A	5				102
エルゴカルシフェロール	D2	5				99.7
α -トコフェロール	E	5				115
酢酸 α -トコフェロール	E	5				99.1
メナキノン、VK2 MK-4	K2	5				91.2
メナキノン、VK2 MK-7	K2	5				104
ルテイン	カロテノイド	5				96.4
リコピン	カロテノイド	5				105

結論

複雑なサプリメントマトリックス中の脂溶性ビタミンと特定のカロテノイドを同定・定量するための、迅速で高感度、かつ正確な LC/TQ メソッドについて述べました。このメソッドでは、Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS に接続した Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用しました。14 種類の脂溶性ビタミンとカロテノイドが 1 回の分析で同時に検出可能で、複数の分析を行う従来の方法と比較して、効率とスループットの向上、コスト削減が実現できました。サプリメント製品中のすべての脂溶性ビタミンとカロテノイドは、マトリックス適合標準の定量アプローチで仕様を満たしました。この評価により、本メソッドが脂溶性ビタミン分析に必要な特異性、直線性、精度を達成できることが実証されました。

参考文献

1. National Research Council. Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk; The National Academies Press, **1989**.
2. Young, A. J.; Lowe, G. L. Carotenoids-Antioxidant Properties. *Antioxidants* **2018**, 7, 28.
3. Simultaneous Detection and Quantitation of 14 Water-Soluble Vitamins in a Supplement by LC/MS/MS Triple-Quadrupole. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3016EN, **2021**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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おりません。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。

DE16169462

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, July 20, 2022

5994-5064JAJP