

Agilent Bond Elut Plexa ポリマー系 SPE と HPLC および LC/MS/MS を用いた 乳児用調合乳中の脂溶性ビタミンの測定

著者

Xia Yang and Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

乳児用調合乳中のビタミン A、ビタミン D2/D3、 α -、 β -、 γ -、および δ -ビタミン E を分析するための効率的かつ堅牢なメソッドを開発し、検証しました。乳児用調合乳サンプルは、最初に鹸化してから、Agilent Bond Elut Plexa ポリマー系 SPE を使用した固相抽出 (SPE) により抽出とクリーンアップを行いました。その後、クリーンアップしたサンプル抽出液中のビタミン A および E を HPLC-DAD で、ビタミン D2 および D3 を LC/MS/MS で分析しました。今回開発したメソッドにより、良好な再現性 (RSD < 10 %) と優れた回収率 (81.2 ~ 97.3 %) が得られ、このメソッドが、容易な操作で脂溶性ビタミンを測定できるシンプルで低コストかつ効率的な手法であることが実証されました。

はじめに

ビタミン A、D、E などの脂溶性ビタミン（図 1）は、人の健康および乳幼児の成長に不可欠な栄養素です。そのため、ビタミン A、D、および E の添加により乳児用調合乳の栄養価を強化することが、食品業界において重要な役割を担っています^{1~3}。ただし、脂溶性ビタミンは排泄されにくく、時間とともに体内に蓄積する傾向にあることから⁴、安全上、乳児用調合乳中のビタミンを正確に定量することが非常に重要になります。

液液抽出（LLE）または固相抽出（SPE）と HPLC または LC/MS の組み合わせによる食品中の脂溶性ビタミンの定量分析に関する文献は多数あります^{5~8}。ただし、乳児用調合乳は、高脂肪でマトリックスが複雑であり、ビタミン A、D、および E の規制検出レベルが大きく異なることから、これらのメソッドを容易には適用できません^{9, 10}。また、栄養強化を目的に乳児用調合乳に添加されるビタミン A および E の形態として、安定性の高い酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール、および酢酸 α -トコフェロールが一般的に使用されており¹¹、その総量を定量するには、サンプルの抽出およびクリーンアップ前に、鹼化またはアルカリ分解によってすべてのエステルをアルコールに変換する必要があります¹²。さらに、内部標準を用いないビタミン A および E の分析には HPLC と DAD が広く使用されていますが、ビタミン D2 および D3 については、クロマトグラフィーでのベースライン分離が常に課題となり、この手法で微量濃度（ppb）を検出するのは容易ではありません。LC/MS/MS であれば、ビタミン D2 および D3 に対する十分な検出感度を得られ、クロマトグラフィーによる完全な

ベースライン分離は必要ありません。ただし、高濃度のビタミン A および E により MS 検出器が飽和し、正確な定量結果が得られないことがあります。また、乳児用調合乳マトリックスから共溶出する脂質が重大なイオン抑制を引き起こす可能性があるため、ビタミン D2 および D3 に対する高価な内部標準が不可欠です。以上の課題を解決するため、今回、鹼化に続いて Bond Elut Plexa で抽出およびクリーンアップを行う、乳児用調合乳サンプルの前処理メソッドを開発しました。前処理後に、ビタミン A および E を HPLC-DAD で、またビタミン D2/D3 を LC/MS/MS 検出により定量しました。この完全な乳児用調合乳分析ソリューションにより、目的とするすべてのビタミンについて、回収率 80 % 超、RSD 10 % 未満という優れた分析性能が得られることが実証されました。

使用機器

- フレキシブルポンプ、マルチサンブラ、可変波長検出器搭載の Agilent 1290 Infinity II LC
- Agilent 1290 Infinity II LC と、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース搭載の Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS
- Agilent Bond Elut Plexa カートリッジ、200 mg、6 mL、40 μ m（部品番号 12109206）
- Agilent Vac Elut 20 マニホールド（部品番号 12234101）
- Organomation Associates 社製（米国マサチューセッツ州）加熱システム搭載窒素蒸発器

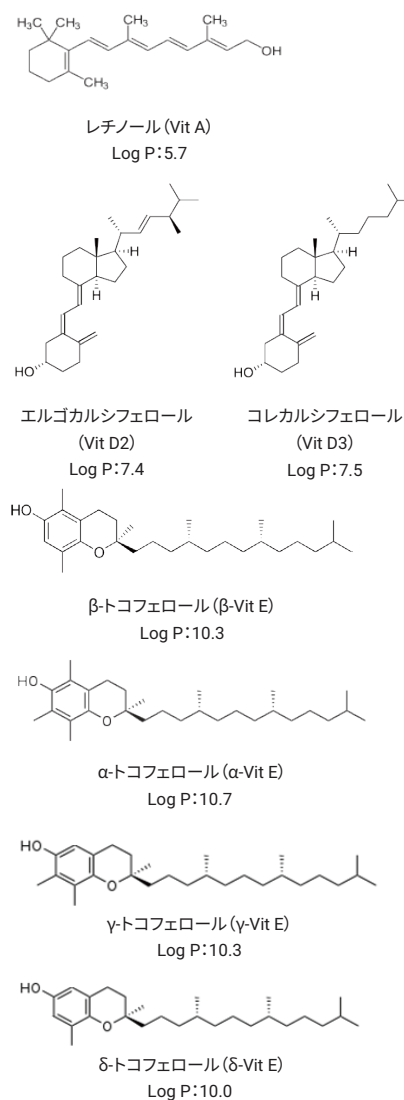


図 1. 脂溶性ビタミンの構造と Log P 値

試薬および標準物質

試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。メタノール (MeOH) は Honeywell 社 (米国ミシガン州 マスキーゴン)、エタノール (EtOH) は Acros Organics 社 (ベルギー ヘール)、アセトンおよび水酸化カリウム (KOH) は Sinopharm 社 (中国 北京) から入手しました。また、アスコルビン酸および 2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール (BHT) は CNW 社 (中国 上海) から入手しました。ビタミン標準試料および内部標準は Alta 社 (中国 天津) から購入し、エタノールで調製して -20 °C で保管しました。

サンプル前処理

ビタミン A および E の原液は、エタノール (EtOH) で 5 mg/mL に調製しました。ビタミン D2、D3、およびそれぞれの内部標準は、EtOH で 10 µg/mL に調製しました。乳児用調合粉乳は、地域のスーパーマーケットで購入しました。図 2 に、主にサンプルの鹼化および SPE クリーンアップで構成される詳細な手順を示します。

まず、調合粉乳 1 g に水 5 mL を加え、十分に混合して均質なスラリーにしました。アスコルビン酸および BHT は、サンプル前処理中のビタミンの分解を防止する酸化防止剤として機能することが報告されていることから¹³、これらの物質をサンプル前処理の最初に加えました。また、ビタミンの溶解性を高め、脂質の多いサンプルと鹼化用の KOH 溶液との均質性を向上するために、EtOH を加えました。80 °C のウォーターバスでの鹼化時には、ビタミンの酸化を防ぐために、サンプルの底部に低流量の窒素流を適用しました。鹼化後、サンプルは黄緑色から濃褐色に変化しました。

LC/MS/MS 条件	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695775-902)
カラム温度	40 °C
オートサンブラ温度	15 °C
注入量	5 µL
移動相	A) 0.1 % FA、4.5 mM ギ酸アンモニウム、および 0.5 mM フッ化アンモニウムの水溶液 B) 0.1 % FA、4.5 mM ギ酸アンモニウム、および 0.5 mM フッ化アンモニウムの MeOH 溶液
流量	0.4 mL/min
グラジエント	時間 (分) %B
	0 88
	1 88
	4 90
	5 93
	5.1 94
	5.8 94
6 100	
ストップタイム	17 min
イオン化モード	ポジティブ
セル加速電圧	4
ガス温度	300 °C
ガス流量	5 L/min
ネブライザ	45 psi
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー	4,000 V

HPLC 条件	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695775-408)
カラム温度	40 °C
オートサンブラ温度	15 °C
注入量	5 µL
移動相	A) 水 B) MeOH
グラジエント	時間 (分) %B 流量 (mL/min)
	0 80 0.5
	2 80 0.5
	3 90 0.5
	6 90 0.5
	7 100 0.5
ストップタイム	9 分
DAD 検出	ビタミン E : 294 nm、ビタミン A : 325 nm

成分名	リテンションタイム	イオンランジション (m/z)	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (eV)
VD2	7.14	397.3 → 379.7	100	10
		397.3 → 91.0		70
VD2-d3	7.13	400.3 → 125.4	120	10
VD3	7.19	385.3 & 259.5	100	10
		385.3 & 367.6		10
VD3-d3	7.18	388.3 → 370.4	100	10

その後、独自のポリマー系 SPE 充填剤が充填された Bond Elut Plexa カートリッジを使用して、サンプルクリーンアップを行いました。このカートリッジでは、高度なポリマー構造によりビタミンの優れた抽出性能が得られ、大型の内因性タンパク質がポア内に結合しません。この性能は、鹼化による極度のアルカリ条件下でも安定して維持されます。サンプルの洗浄では、約 10 mL の水でカートリッジを洗浄してから (pH 試験紙で確認可能)、80/20 MeOH/水の混合液で疎水性の干渉物質を除去しました。サンプルクリーンアップ後、サンプルの半分を HPLC-DAD でテストしてビタミン A および E を分析し、残り半分を LC/MS/MS でテストしてビタミン D2 および D3 を分析しました。

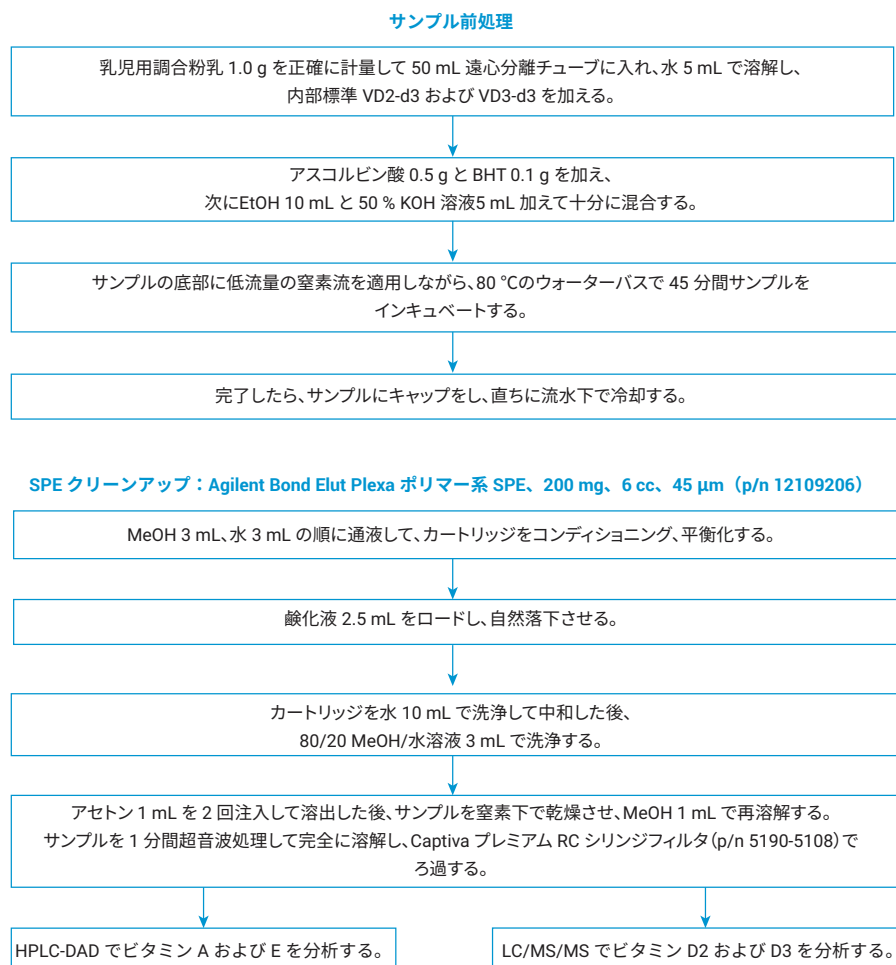


図 2. Agilent Bond Elut Plexa ポリマー系 SPE を用いた乳児用調合粉乳中の脂溶性ビタミン分析のためのサンプル前処理手順

メソッドバリデーションおよび考察

HPLC 分析用に、MeOH にビタミン A および E を 0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、100、および 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でスパイクした標準溶液を調製しました。また、LC/MS/MS 分析用に、MeOH にビタミン D2 および D3 を 1、5、10、20、50、100、200、500、および 1,000

ng/mL でスパイクした、80 ng/mL の内部標準を含む標準溶液を調製しました。これらの標準溶液を測定して、各試薬の検量線を作成しました。HPLC-DAD では、Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP カラムにより、ビタミン A および 4 つの形態のビタミン E に対して優れたピーク形状とベースライン

分離が得られました。ビタミン D2 および D3 の分析には、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムを使用しました。このカラムにより、マトリックス干渉のある状況で十分なクロマトグラフィー分離が得られました。両方のクロマトグラムを図 3 に示します。

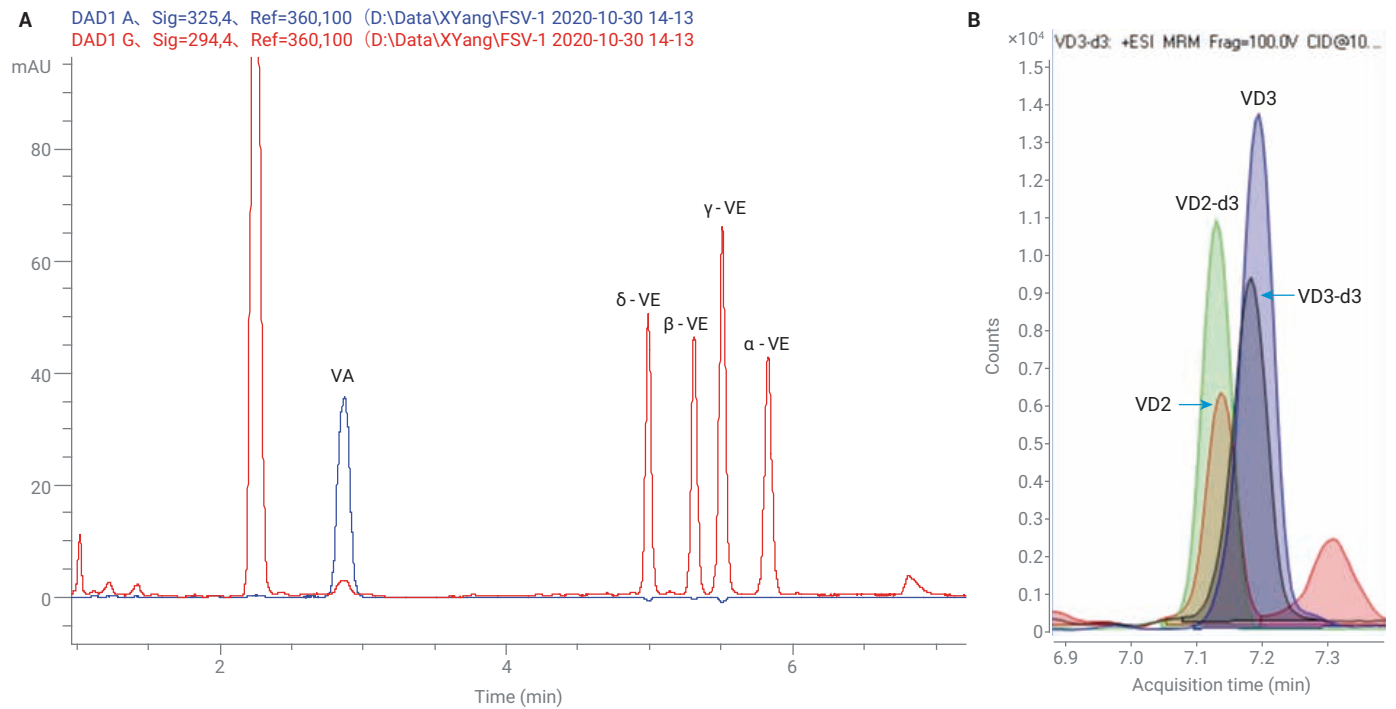
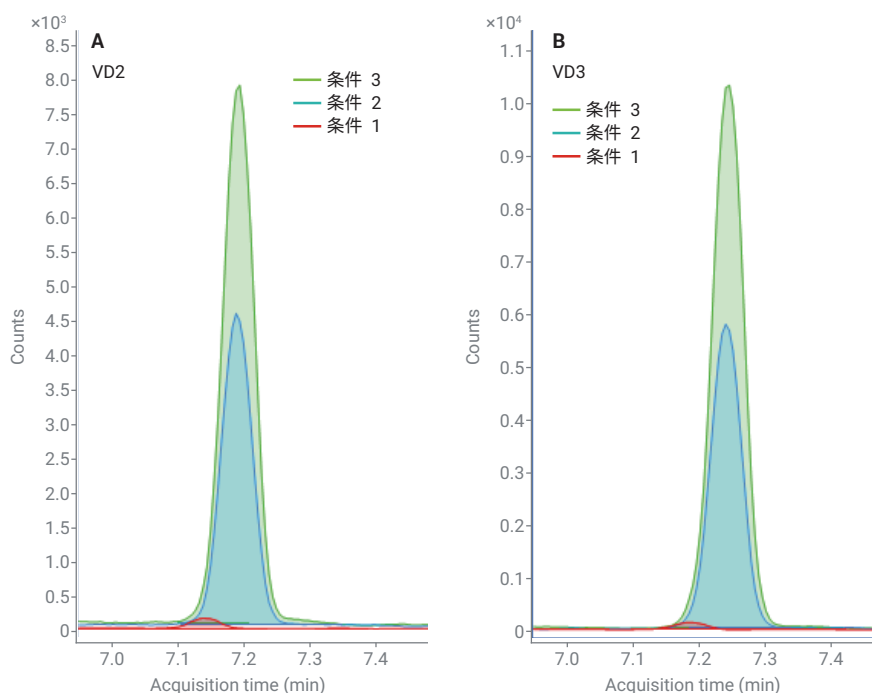


図 3. A : ビタミン A (325 nm) を 25 $\mu\text{g}/\text{g}$ で、 α -、 β -、 γ -、および δ -ビタミン E (294 nm) を 250 $\mu\text{g}/\text{g}$ でスパイクした乳児用調合乳の HPLC クロマトグラム。
 B : ビタミン D2 および D3 を 0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ で、またそれぞれの内部標準を 0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ でスパイクした乳児用調合乳の LC/MS/MS クロマトグラム

また、適切な移動相添加物を使用することで、ビタミン D2 および D3 に対する LC/MS/MS 感度が大幅に向上しました。図 4 に示すように、4.5 mM のギ酸アンモニウムを添加することにより（条件 2）、ギ酸のみが含まれる移動相（条件 1）よりもピーク強度が格段に高まりました。さらにフッ化アンモニウムを添加した条件 3 では、LC/MS/MS におけるビタミン D2 および D3 のイオン化効率が向上し、レスポンスが条件 2 の 2 倍になっています。



LC/MS の 移動相条件	ピーク高の比率	
	ビタミン D2	ビタミン D3
条件 1	1	1
条件 2	30	41
条件 3	54	73

図 4. さまざまな移動相条件下でのビタミン D2 および D3 のピーク強度。条件 1：A) 0.1 % FA の MeOH 溶液、B) 0.1 % FA の水溶液。条件 2：A) 0.1 % FA および 4.5 mM ギ酸アンモニウムの MeOH 溶液、B) 0.1 % FA および 4.5 mM ギ酸アンモニウムの水溶液。条件 3：A) 0.1 % FA、4.5 mM ギ酸アンモニウム、および 0.5 mM フッ化アンモニウムの MeOH 溶液、B) 0.1 % FA、4.5 mM ギ酸アンモニウム、および 0.5 mM フッ化アンモニウムの水溶液

LC/MS/MS および HPLC で得られたデータは、それぞれ Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアと Agilent ChemStation ソフトウェアで解析しました。検量線を図 5 に示します。ビタミン A および E については、重みなし直線回帰適合により、0.05 ~ 200 µg/mL のダイナミックレンジで R² が 0.999 の検量線が得られました。また、ビタミン D2 および D3 については、1/x の重み付き直線回帰適合により、1 ~ 1,000 ng/mL のダイナミックレンジで R² がそれぞれ 0.998 および 0.999 の検量線が得られました。

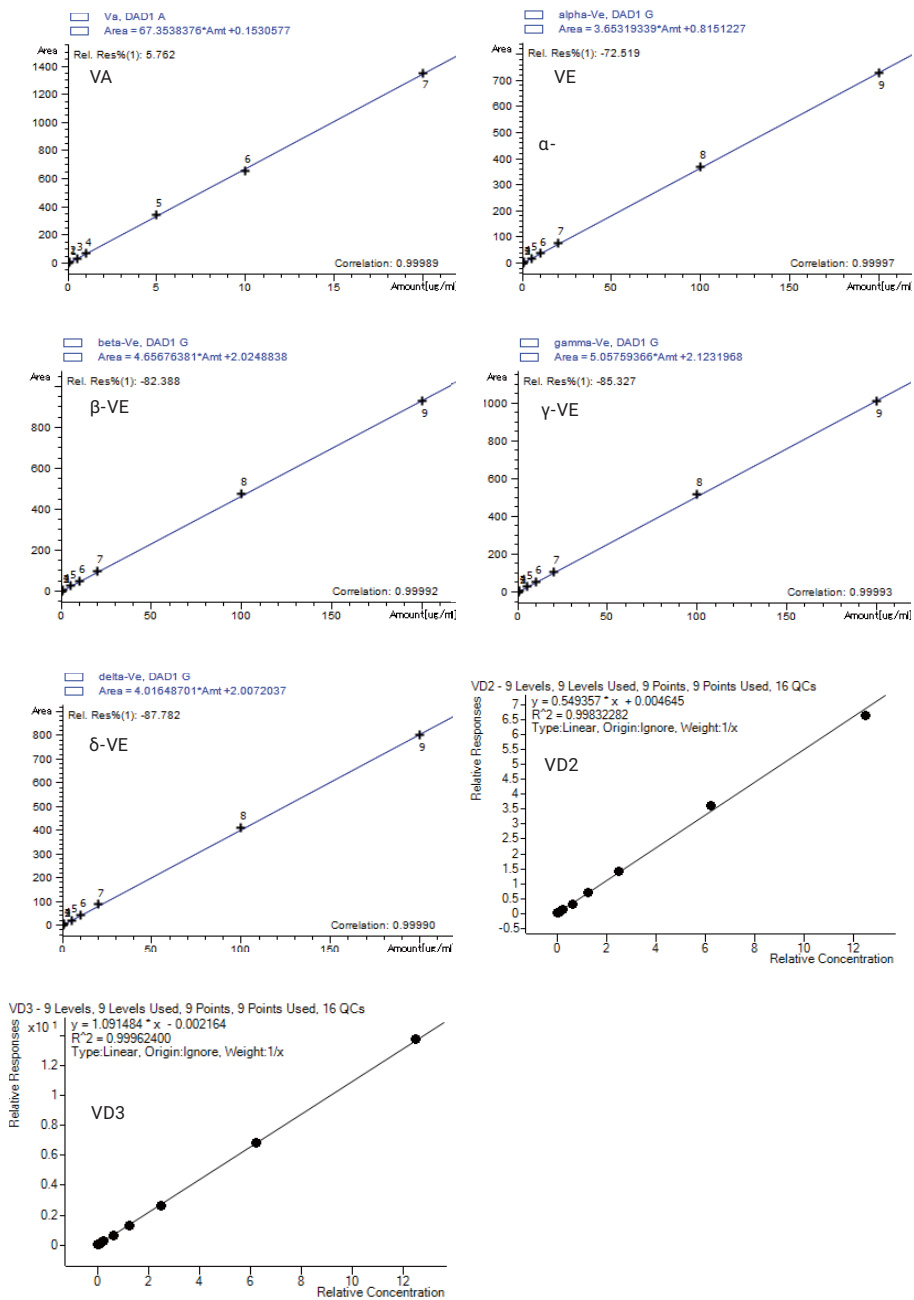


図 5. HPLC-DAD 分析によるビタミン A および E の検量線と、LC/MS/MS 分析によるビタミン D2 および D3 の検量線

真度と精度を評価するために、低および高スパイクレベルの QC サンプルを 4 回繰り返し分析しました。その結果を表 1 に示します。乳児用調合乳には幅広い栄養強化添加物が使用されており、実際のマトリックスブランクを特定するのは不可能なことから、作成した検量線にもとづいて各成分の定量を行いました。LC/MS/MS でのマトリックス効果は、各成分の安定標識 IS を使用することにより補正しました。一方、LC-DAD では、クロマトグラフィーで良好な分離が観察されている限り、マトリックス効果が問題になることはありませんでした。マトリックスコントロールを事前に定量したところ、ビタミン E のおおよその濃

度が非常に高濃度 (α -トコフェロール相当で総濃度 9.8 mg/100 g) である一方、ビタミン D3 は低濃度 (13 μ g/100 g) であることが示されました。この結果から、すべてのビタミンを HPLC-DAD または LC/MS/MS のいずれかで同時に定量することがきわめて困難であり、ビタミン A および E の高濃度定量には HPLC-DAD を、またビタミン D2 および D3 の低濃度定量には LC/MS/MS を使用する必要があることが判明しました。真度と精度の評価では、2 種類のスパイクレベルの QC サンプルを調製して 4 回繰り返し分析し、マトリックスコントロールの寄与を補正しました。低 QC サンプルには、各ビタミンをマトリックスコ

ントロールの 2 ~ 3 倍の濃度でスパイクし、高 QC サンプルには、4 ~ 5 倍の濃度でスパイクしました。各 QC サンプルの測定後、マトリックスコントロールの寄与を考慮して濃度計算値を補正し、補正後の濃度計算値と実際のスパイク濃度の比率として回収率を求めました。すべての回収率データは 80 % を超え、RSD は 10 % 未満でした。

表 1. 低および高スパイクレベルの乳児用調合粉乳に含まれる各ビタミンのメソッド定量結果 (n = 4)

成分	マトリックス		QC-低					QC-高				
	バックグラウンド (μ g/g)	RSD% (n = 4)	スパイクレベル (μ g/g)	濃度計算値 (μ g/g)	補正後の濃度 (μ g/g)	回収率 %	RSD% (n = 4)	スパイクレベル (μ g/g)	濃度計算値 (μ g/g)	補正後の濃度 (μ g/g)	回収率 %	RSD% (n = 4)
VA	5.4	9.1	15.0	19.5	14.1	95.6	8.5	25.0	27.5	22.1	89.9	8.9
VD2	0	0	0.4	0.36	0.36	89.5	2.0	0.8	0.65	0.65	81.2	4.5
VD3	0.13	6.2	0.4	0.46	0.33	87.9	3.4	0.8	0.88	0.75	94.6	2.2
α -VE	87.2	2.4	150.0	229.3	142.1	96.7	8.8	250.0	301.3	214.1	89.4	1.5
β -VE	1.3	6.5	150.0	144.0	142.7	95.2	5.6	250.0	213.3	212.0	84.9	2.2
γ -VE	99.5	1.2	150.0	242.7	143.2	97.3	6.9	250.0	309.3	209.8	88.5	1.5
δ -VE	44.0	6.6	150.0	186.7	142.7	96.2	8.6	250.0	248	204.0	84.4	3.2

結論

今回の研究により、サンプルの酸化に続いて Agilent Bond Elut Plexa ポリマー系 SPE で抽出およびクリーンアップを行う、乳児用調合乳中の脂溶性ビタミンの分析ワークフローが、効率的かつ堅牢であることが実証されました。HPLC-DAD および LC/MS/MS の 2 種類のプラットフォームを使用することで、乳児用調合乳中の複数のビタミンに適した定量レベルが得られました。また、メソッドバリデーションでは、優れた回収率 (81.2 ~ 97.3 %) と精度 (RSD 8.9 % 未満) が示されました。

参考文献

1. Michael, F. H. et al. The Vitamin D Content of Fortified Milk and Infant Formula. *N. Engl. J. Med.* **1992**, 326, 1178–1181.
2. Alfred, S. Vitamin A Deficiency **2001**.
3. Ronald J. S. et al. Vitamin E Deficiency with Normal Serum Vitamin E Concentrations in Children with Chronic Cholestasis, *N. Engl. J. Med.* **1984**, 310, 1209–1212.
4. Guideline for Vitamin A & D Fortification of Fluid Milk, The Dairy Practices Council, <http://www.dairypc.org>.
5. Yuan, Z. et al. A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010, *Molecules* **2018**, 23, 1484–1509.
6. Muhammad, I. K. et al. Optimization and Validation of RP-LC/UV-VIS Detection Method for Simultaneous Determination of Fat-Soluble Anti-Oxidant Vitamins, all-trans-Retinol and α -Tocopherol in Human Serum: Effect of Experimental Parameters, *Chromatographia* **2010**, 71, 577–586.
7. Barakat, I. S. A.; Hammouri, M. K.; Habib, I. Simultaneous Determination of Vitamins A and D3 in Dairy Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *IOP Conf. Ser.: Mater.Sci.Eng.* **2015**, 92, 012020.
8. Xiuping, X.; Jinming, Y.; Pingli, H. Simultaneous Determination of Five Fat-Soluble Vitamins in Feed by High-Performance Liquid Chromatography Following Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr.Sci.* **2008**, 46, 345–350.
9. SRM 1849a Infant/Adult Nutritional Formula I; SRM 1869 Infant/Adult Nutritional Formula II, National Institute of Standards & Technology.
10. GB 5009.82-2016, Chinese Regulation Method for Vitamin A, D and E in Food.
11. Rodas, M. B. et al. Rapid Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Vitamins A and E in Infant Formulas. *J. Chromatogr.A.* **2003**, 1018, 197–202.
12. Kienen, V. et al. Development of a Green Chromatographic Method for Determination of Fat-Soluble Vitamins in Food and Pharmaceutical Supplement. *Talanta* **2008**, 75, 141–146.
13. Chen, L. et al. Determination of Fat-soluble Vitamins in Food and Pharmaceutical Supplements Using Packed-fiber Solid Phase Extraction (PFSPE) for Sample Preconcentration/Clean-up. *Procedia Environ. Sci.* **2011**, 8, 588–595.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, December 22, 2020

5994-2948JAJP

DE.7939814815