

Agilent ZORBAX Eclipse Plusカラムを用いた水溶性ビタミンの逆相HPLC分離

アプリケーション

製薬、食品/飲料

著者

Anna Glinko, Michael J. Bozym, Michelle L. Owens, and
Karyn M. Usher
Department of Chemistry
West Chester University
West Chester, PA 19383
USA

Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE, 19808
USA

概要

6種類のビタミン B およびビタミン C の混合物を、同一の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 相の 3 種類の粒子径および寸法のカラムで分離しました。使用した粒子径および寸法は、5 μm (4.6 \times 150 mm)、Rapid Resolution (RR) 3.5 μm (4.6 \times 100 mm)、RR High Throughput (RRHT) 1.8 μm (4.6 \times 50 mm) です。単純なリン酸バッファのメタノール移動相グラジエントを使用しました。このメソッドは、米国薬局方 (USP) メソッドを補完するものとして設計されました。USP メソッドでは各ビタミンが異なるメソッドにより異なるカラムでのみ分離され、一部では複雑なイオン対試薬が用いられます。短いカラムの使用により、分離能を損なわずに、分離スピードを向上させることができました。1.8 μm カラムでは、すべての化合物が3.5分で分離されました。カラム長と粒子径を小さくした場合には、感度も著しく向上しました。HPLC メソッドを用いて、マルチビタミン剤や各種ソフトドリンクなどの市販製品に含まれるビタミンを分析しました。本研究で使用したカラムでは良好な分離能が得られましたが、RRHT カラムではそれに加えて、分離能やスピードを損なわずに、迅速なメソッド開発を行なうことができました。ZORBAX Eclipse Plus カラムは高い効率と優れた性能を示し、テーリングも最小限に抑えられました。

はじめに

ビタミンは人体の機能に欠かせない栄養素です。1日の必要摂取量は少なく、2.4~90 mg 程度です[1]。ビタミンの摂取量が不足すると、副腎不全(ビタミンB)、壊血病や免疫システムの異常(ビタミンC)といったさまざまな健康上の問題が生じます。ピリドキシンとシアノコバラミンを除くと、水溶性ビタミンは体内に貯蔵されません[1]。マルチビタミン剤を毎日摂取すれば、食事だけでは補いきれない場合でも、適切な量のビタミンをとることができます。

ビタミンの多くは、熱や光、酸素により容易に分解します。アスコルビン酸は、水溶液中ですぐに分解することが知られています。こうした分解については、さまざまな pH の溶液中や、好気性および嫌気性条件で研究されています[2]。また、アスコルビン酸を短時間で著しく分解する物質が、ガラス内面に含まれている可能性があることも示唆されています。MargolisとParkの発表した研究では、こうした作用はクロマトグラフィ分析の際にサンプルを入れるオートサンプリングで顕著だと指摘されています。MargolisとParkの論文では、この分解を防ぐ複数の対策が提案されています[3]。本アプリケーションでは、ビタミンサンプルを必要に応じて4時間ごとに調製しました。

アスコルビン酸の相対標準偏差(%RSD)はきわめて良好でしたが、注入は溶液調整後ただちに行ないました。溶液調整から2時間のうちに、連続注入によりアスコルビン酸のピークが減少することが観察されました。



現在、米国薬局方(USP)は、本研究に用いたビタミンの分析に関する複数の標準メソッドを示しています。しかし、使用した混合液に含まれる8種類の水溶性ビタミンすべてを分離できるUSPメソッドはありません。一部のUSPメソッドは複雑で、イオン対試薬を使用するものもあります(表1参照)。イオン対試薬は分離能を向上させるためにしばしば用いられますが、カラム性能を不可逆的に変化させるおそれがあります[4]。現在のところ、アスコルビン酸分析のUSPメソッドは、クロマトグラフィメソッドではありません。さらに、これらのUSPメソッドは、寸法の小さいカラムのサブ2ミクロン粒子径など、一部の新しいカラム技術で使うことができません。

本研究の主目的は、水溶性ビタミンのアスコルビン酸、ピオチン、シアノコバラミン、ナイアシンアミド、パントテン酸、ピリドキシン、リボフラビン、チアミンを分離できる単一の高性能液体クロマトグラフィメソッドを開発することです。図1に各ビタミンの構造を示しています。第2の目的は、粒子径の小型化が分離能、分離時間、システム圧力に及ぼす効果を示すことです。

実験手法

分析には、オートサンプラと80-Hzダイオードアレイ検出器を備えたAgilent 1200 SL Rapid Resolution液体クロマトグラフ(LC)を使用しました。アイソクラティックグラジエントとバイナリグラジエントは、いずれもこのシステムにより実施しました。本研究で使用したカラムは、4.6 mm x 150 mmの5 µm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 カラム(部品番号959993-902)、4.6 mm x 100 mmの3.5-µm ZORBAX Eclipse Plus C-18 カラム(部品番号959961-902)、4.6 mm x 50 mmの1.8 µm ZORBAX Eclipse Plus C-18 カラム(部品番号959941-902)です。

ビタミン標準物質は、Sigma Aldrich(ウイスコンシン州ミルウォーキー)から入手しました。ダイオードアレイ検出器の高速フルスペクトルUV-VIS検出により、標準混合物質、サプリメント、ビタミン飲料中に含まれるビタミンを同定しました。

表1. USPメソッド(USP31-NF 26, 2008年5月、参考文献5)の試薬と要件

ビタミン	必要な試薬	テーリング ファクター(TF)	%RSD t _R
ピリドキシン	氷酢酸、1-ヘキサンスルホン酸 ナトリウム、メタノール、水	-	< 3%
チアミン	1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、 リン酸、塩酸、アセトニトリル、 水	< 2	< 3%
シアノコバラミン	メタノール、水	-	-
パントテン酸	リン酸2水素カリウム、リン酸、 メタノール、水	-	< 2%
ピオチン	過塩素酸ナトリウム、リン酸、 ジメチルスルホキシド、 アセトニトリル、水	-	< 3%
ナイアシン	1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、 メタノール、アセトニトリル、 氷酢酸、水	< 2	< 2%
リボフラビン	氷酢酸、エデト酸2ナトリウム、 酢酸ナトリウム、トリエチルアミン、 メタノール、水	-	< 2%

移動相 A には 25 mM NaH₂PO₄ (pH = 2.5)、移動相 B にはメタノールを用いました。流量は1.0 mL/分です。表2にすべてのクロマトグラフィ条件を記載しています。

移動相グラジエントは、溶媒の強度と選択性(k*)が同一になるように、カラムの長さによって部分的に変更しました(表3参照)。

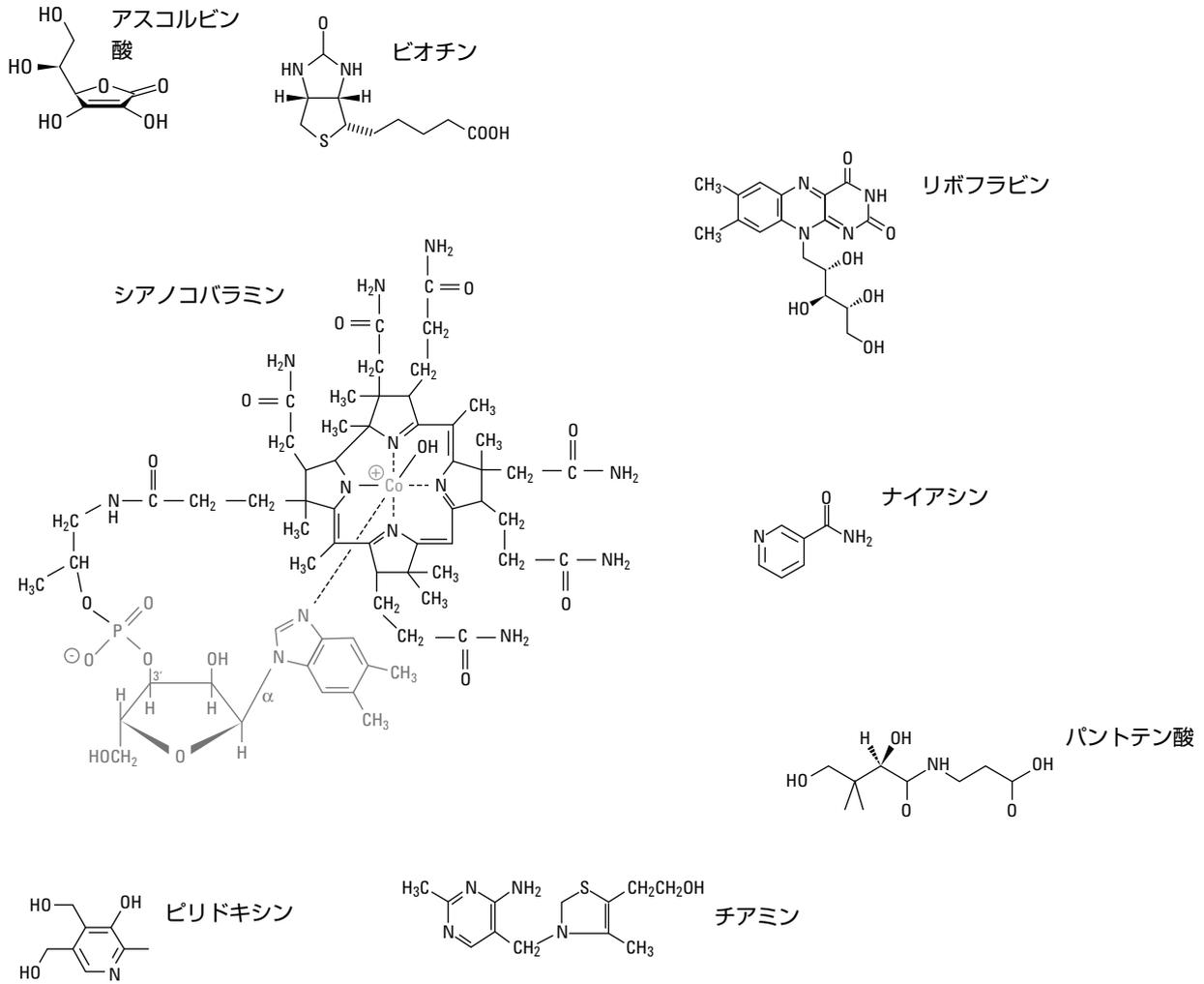


図1. 本実験に用いた水溶性ビタミンの構造

表2. クロマトグラフィ条件

LC	Agilent 1200 SL
移動相 A	25 mM NaH ₂ PO ₄ pH = 2.5
移動相 B	メタノール
流量	1.00 mL/分
カラム恒温槽温度	35 °C
検出	220 nm、参照なし
反応時間	0.05 s
注入量	カラムサイズに応じて調整： 5 μm、5 μL 3.5 μm、3.3 μL 1.8 μm、1.7 μL
検出器フローセル	マイクロフローセル(2 μL)

表3. 等価のk*値を得るためのグラジエント

%B	5 μm	3.5 μm	1.8 μm
1	0.00 min	→ 0.00 min	→ 0.00 min
12	1.50 min	1.00 min	0.50 min
30	1.53 min	1.03 min	0.51 min

分析用天秤または微量天秤を必要に応じて用いて各ビタミンの適量を計量し、水 10 mL に溶解して、各標準物質と標準混合物を調製しました。ビタミンを分析したサンプルは、すべて地元で購入しました。Vitaminwater (Glaceau、ニューヨーク州フラッシング)については、希釈せずに注入しました。サンプル前処理の際には、チュアブルビタミン錠 (Berkley & JensenのChildren's Chewable Complete Multi Vitamins and Minerals Supplement、マサチューセッツ州ナティック)については、粉末状にしたのち、水 100 mL に溶解しました。成人用錠剤 (Equate Adult Multivitamin、Walmart、アーカンソー州ベントンビル)も同様に調製しました。表4には、すべての各標準物質およびビタミン錠剤の最終濃度をまとめています。注入に先立ち、アジレント製シリンジエコノフィルタ (再生セルロース、直径 25-mm、多孔度 0.20 μm 、部品番号 5185-5830)を用いて、すべてのサンプルをろ過しました。

結果と考察

クロマトグラフィの再現性

各ビタミンの反復注入で得られた %RSD を表5に示しています。これらの値は、各ビタミンを7回反復注入して算出したものです。表5には、1.8 μm カラムの再現性データを得るために用いた標準物質中の各ビタミン濃度とともに、リテンションタイム、面積、テーリングファクター (5%の高さ)の %RSD を記載しています。一部の USP メソッドでは、リテンションタイムの %RSD が 2 ないし 3% 未満であることが求められています (表1参照)。シアノコバラミンのメソッドについては、そうした要件はありません。表5では、すべての %RSD 値が要件範囲内で、しかも規定の上限よりも大幅に低いことが示されています。

表 4. 各ビタミンのピークと濃度

Pk #	ビタミン	標準物質中の濃度 (g/L)	成人用ビタミン錠剤溶液中の濃度 (g/L)	チュアブルサプリメント溶液中の濃度 (g/L)
1	アスコルビン酸	8×10^{-2}	9×10^{-1}	6×10^{-1}
2	ナイアシン	4.5×10^{-2}	1.5×10^{-1}	2×10^{-1}
3	ピリドキシン	9×10^{-2}	5×10^{-2}	2×10^{-2}
4	パントテン酸	2.4×10^{-1}	1×10^{-1}	1×10^{-1}
5	シアノコバラミン	9×10^{-2}	2×10^{-5}	6×10^{-5}
6	ビオチン	飽和	3×10^{-4}	4×10^{-4}
7	リボフラビン	1.5×10^{-1}	3.2×10^{-2}	1.7×10^{-2}

表 5. 1.8 μm カラムにおける %RSD

ビタミン	濃度 g/L	%RSD t_R	%RSD 面積	%RSD TF
チアミン	1.20	0.7	0.3	1.3
アスコルビン酸	0.11	0.2	0.9	0.6
ナイアシン	0.15	0.5	0.3	0.9
ピリドキシン	0.09	0.3	1.8	1.9
パントテン酸	0.24	0.0	0.4	0.7
シアノコバラミン	0.18	1.4	0.9	0.4
ビオチン	飽和	0.2	2.9	4.2
リボフラビン	0.15	0.2	2.3	0.9

ピーク高 5% におけるテーリングファクターの比較

表6には、本実験に用いた3種類の ZORBAX Eclipse Plus カラムにおける各溶質のリテンションタイムとテーリングファクターを示しています。これらのカラムは表面の不活性がきわめて高く、各水溶性ビタミンのテーリングはほとんど見られません。分析した全ビタミンの平均テーリングファクターが、使用したすべてのカラムで 1.2 未満であることに注目してください。この値は、USP メソッドで規定されている許容テーリングファクターの範囲内に十分に収まっています (表1参照)。

表 6. 3種類の Agilent ZORBAX Eclipse Plus カラムにおける各溶質のリテンションタイムとピーク高 5% のテーリングファクターの比較

	5 μm		3.5 μm		1.8 μm	
	リテンション タイム	テーリング ファクター	リテンション タイム	テーリング ファクター	リテンション タイム	テーリング ファクター
ビタミン						
アスコルビン酸	2.10	1.1	1.41	1.2	0.76	1.2
ナイアシン	2.62	1.1	1.87	1.2	1.01	1.2
ピリドキシン	3.03	1.1	2.25	1.3	1.31	1.3
パントテン酸	4.02	1.1	2.95	1.1	1.68	1.2
シアノコバラミン	4.47	1.1	3.33	1.1	1.98	1.2
ビオチン	6.33	1.1	4.69	1.1	2.63	1.0
リボフラビン	7.24	1.1	5.40	1.1	3.04	1.1
平均(Tf)	—	1.1	—	1.2	—	1.2

1つのカラムコンフィグレーションから別のカラムコンフィグレーションへの拡張性

図2に示すように、3種類のカラムコンフィグレーションの溶出パターンはほぼ同じです。ZORBAX 粒子カラムでは、5 μmおよび3.5 μm 粒子を充填した長いカラムから1.8 μm 粒子を充填した最短カラムへ直接メソッドを拡張することが可能です。使用した3種類のカラムすべてに、同じ混合物質を注入しました。等しいk*値を得るために、表3に記載されているようにグラジエント時間を調節しました。

3種類のカラムコンフィグレーションを比較した場合の感度の変化

表7には、3種類のカラムに標準ビタミン混合液を注入して得られたシアノコバラミンの感度の変化を示しています。注

入量はカラム長に比例して増減するため、ピーク高を直接的に比較することはできません。代替策として、注入量を標準化することで、感度の比較が可能になります。標準化したあとのピーク面積と注入量の比率は同じです。しかし、高さとの注入量の比率については、大幅な違いがあることが見てとれます。5 μm カラムに比べて、3.5 μm カラムでは感度が大幅に向上しており、1.8 μm カラムではさらに向上しています。表7には、5 μm カラムと比較した場合の感度の上昇率を示しています。5 μm カラムから3.5 μm カラムに変更した場合の感度の上昇率は34%、5 μm カラムから1.8 μm カラムに変更した場合の上昇率は52%です。感度が向上するのは、単に分析物のカラム滞留時間が短くなるためだけではなく、小型粒子では効率が向上(すなわち、希釈係数が低下)するためです。

表 7. 3種類のカラムコンフィグレーションの感度比較 (シアノコバラミン)

カラム	標準化した 注入量		面積		高さ		感度の 上昇率%
	面積	面積%	高さ	高さ%			
5 μm	100	269	—	49	—	—	
3.5 μm	66	171	64	48	98	34	
1.8 μm	33	91	34	42	86	52	

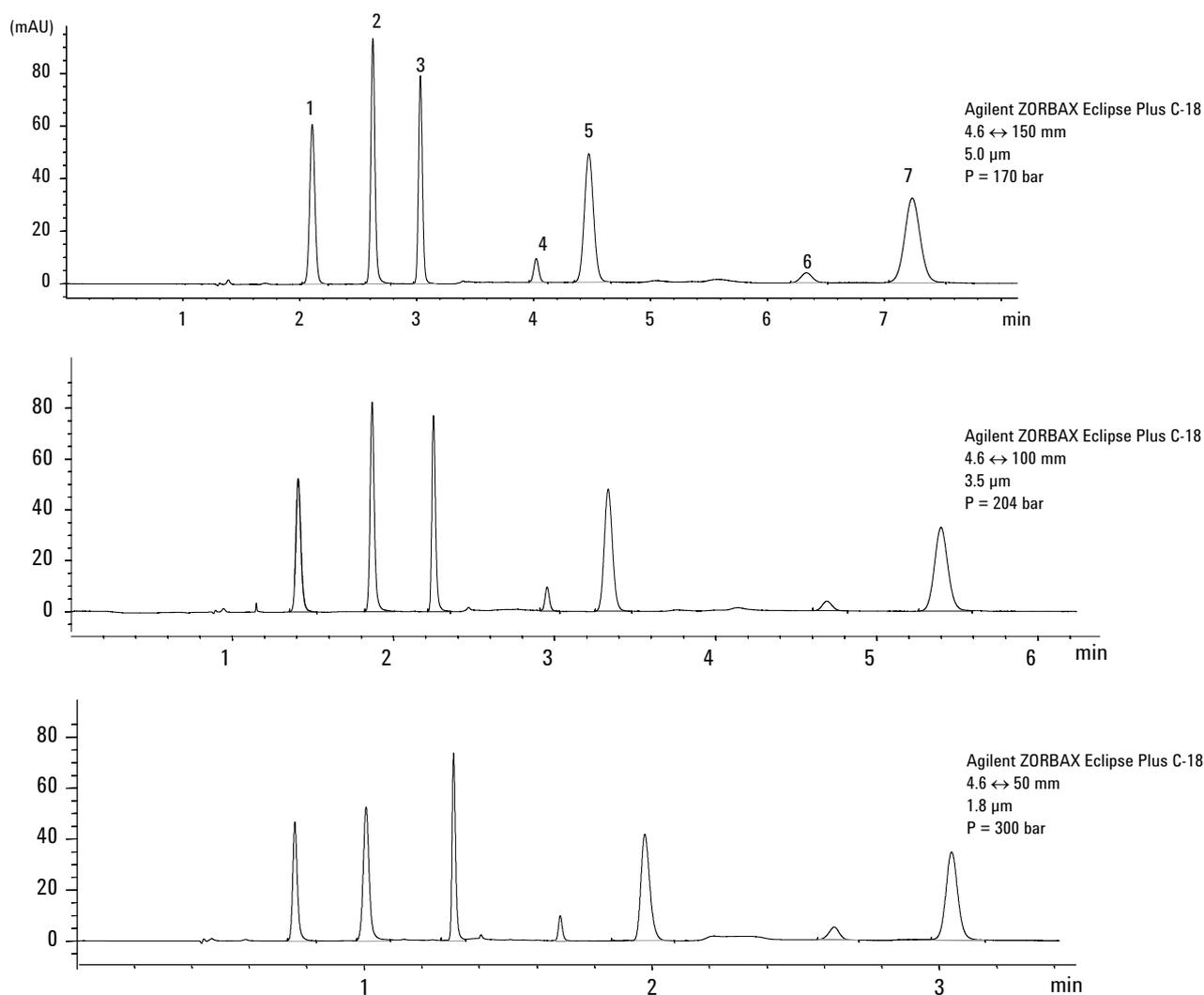


図 2. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 カラムの拡張性と、分析時間および圧力に与える影響 (条件は表 2 を参照)

3 種類のカラムコンフィグレーションにおけるスピードと圧力の比較

図 2 には、各カラムの分離時間の違いを示しています。5 μm カラム (4.6 x 150 mm) では 8 分だった分離時間が、RRHT の 1.8 μm カラム (4.6 x 50 mm) では 3.5 分に短縮されました。流量を上げれば、分離時間をさらに短縮することが可能です。図 2 のピーク分離能が良好なため、流量を上げることも可能であると判断しました。しかし、実際に試した際には、オーバーラップする他の未知成分が存在したことから、

市販ビタミン剤および飲料のピークの一部が同定されませんでした。予想されていたとおり、カラムに充填された粒子径が小さくなると、圧力が上昇しました。図 2 には、各カラムのシステム圧力 (P、単位 bar) を示しています。1.8 μm カラム (RRHT) を使用した際には、システム圧力が最高の 300 bar に達しました。この数値は、Agilent 1100 (最高 400 bar) および 1200 SL (最高 600 bar) システムのいずれについても、十分動作範囲内に収まっています。分析の結果を表 8 にまとめています。

表 8. 各カラムコンフィグレーションのグラジエント分離結果 (k* は一定)

カラムコンフィグレーション			分離特性	
長さ (mm)	粒子 (μm)	流量 (mL/分)	グラジエント時間 (分)	圧力 (bar)
150	5	1	8	170
100	3.5	1	6	204
50	1.8	1	3.5	300

ビタミンサプリメントに含まれる水溶性ビタミンの同定と定量

図3には、2種類のビタミンサプリメントのクロマトグラムを示しています。上のクロマトグラムは Equate Adult Multivitamin、下のクロマトグラムは Berkley & Jensen の Children's Chewable Multivitamin です。サンプル中で陽性と同定された水溶性ビタミンを図3に示しています。また、各ピーク番号にあたるビタミンを表4に記載していません。一次同定はリテンションタイムをもとにしましたが、二次同定はUVスペクトルを用いて各ビタミンについて実施しました。標準混合物に含まれる水溶性ビタミンは7種類ですが、ビタミンサプリメントに含まれるチアミンの同定と定量を可能にするために、8番目の水溶性ビタミンとしてチアミンを追加しました。

成人用ビタミン剤では、原液中に含まれる7種類のビタミンのうち5種類が同定されました。ピオチンも同定されましたが、サンプル中の濃度がきわめて低かったため、正確なリテンションタイムと面積カウントは記録できませんでした。子ども用チュアブルビタミン剤では、原液中に含まれる7種類のビタミンのうち6種類が同定されました。同定されたビタミンに加えて、分析したいずれのビタミン剤においても、t0後の最初のピークがチアミンと同定されました。体内で必要とされる量は、それぞれのビタミンにより異なります。サンプル中の濃度がきわめて幅広いため、すべてのビタミンで良好なピーク形状を示すクロマトグラムを、UV-VIS 検出により得ることはできませんでした。たとえば、アスコルビン

酸、ナイアシン、ピリドキシンは、体内での必要量が大きいため、ビタミン錠にも高い濃度で含まれます。そのため、クロマトグラム中のピークはきわめて大きくなります。標準混合物の分析時には1.7 μLを注入しましたが、図3のクロマトグラムでは、注入量を15 μLに変更しました。これは、低濃度で存在するビタミンのピークを得るためです。いずれのクロマトグラムでも、シアノコバラミンは同定されませんでした。これは、体内での必要量がきわめて小さいことから、ビタミンサンプル中に数マイクログラムしか含まれていないためです。表9には、成人用および子ども用マルチビタミン剤に含まれるチアミン、ナイアシン、ピリドキシンの定量データを示しています。測定値は、錠剤ボトルのラベルから得た予測値とほぼ一致しています。

一般的なビタミン飲料やエネルギー飲料も分析しました。分析したのは、無糖 Red Bull (Red Bull, N.A., Inc., カリフォルニア州サンタモニカ)とストロベリーキウイ味の Vitaminwater です。これらの飲料では通常、アスコルビン酸、ナイアシン、ピリドキシンが検出される可能性がありますが、シアノコバラミンについては、添加されていることが明らかな場合でも、クロマトグラム中にピークが生じませんでした。シアノコバラミンのシグナルが表れないのは、飲料中の濃度が低いためです。表10には、無糖 Red Bull およびストロベリーキウイ味の Vitaminwater に含まれるナイアシンとピリドキシンの定量データを示しています。

表9. 子ども用および成人用マルチビタミン剤に含まれるビタミンの定量

ビタミン	サプリメント	予測値 (mg/tab)	測定値 (mg/tab)
チアミン	成人用 マルチビタミン剤	1.5	-
チアミン	子ども用 マルチビタミン剤	1.5	1.8
ナイアシン	成人用 マルチビタミン剤	20	22.6
ナイアシン	子ども用 マルチビタミン剤	20	22.2
ピリドキシン	成人用 マルチビタミン剤	2	2.0
ピリドキシン	子ども用 マルチビタミン剤	2	2.5

表10. 一般的な飲料に含まれるビタミンの定量

ビタミン	サプリメント	予測値 (mg)	測定値 (mg)
ナイアシン	Vitaminwater	12.5	12.1
ナイアシン	Red Bull、 無糖	21.2	30
ピリドキシン	Vitaminwater	5.0	5.8
ピリドキシン	Red Bull、 無糖	2.1	2.4

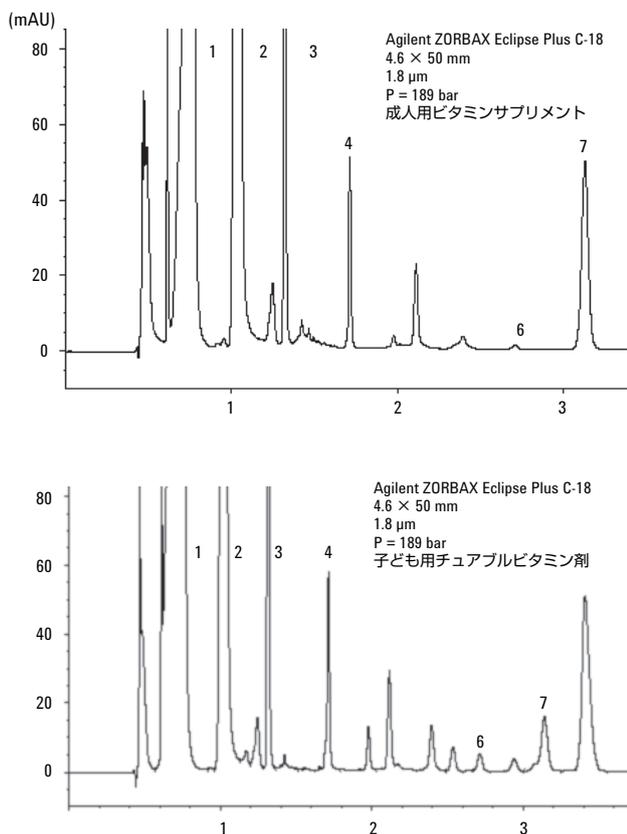


図 3. 同一条件における成人用マルチビタミンサプリメントおよび子ども用チュアブルビタミン剤の溶液のクロマトグラム。条件は図 2 に記載されたものと同じです。各ピーク番号にあたるビタミンは表 4 に記載されています。

結論

本アプリケーションのクロマトグラフィメソッドでは、イオン対試薬を使わずに、標準溶液中の水溶性ビタミンを分離することができました。成人用ビタミンサプリメントに含まれる分析対象のビタミン 8 種類のうち 6 種類が、リテンションタイムと UV スペクトルにより同定されました。子ども用チュアブルマルチビタミン剤については、同じメソッドで、8 種類中 7 種類のビタミンが同定されました。いずれのビタミン剤でもシアノコバラミンは同定されませんでした。これは、ビタミン剤中に含まれる濃度がきわめて小さいためです。また、ビタミン飲料中の濃度は、本メソッドの検出下限未満でした。2 種類の市販ビタミン錠剤について、チアミン、ナイアシン、ピリドキシンの定量を行ないました。2 種類の一般的なエネルギー/ビタミン飲料についても、ナイアシンとピリドキシンの同定と定量を実施しました。この実験により、各種の市販製品に含まれるビタミンの同定に本メソッドが適していることが証明されました。

このメソッドは、ZORBAX Eclipse Plus カラムが水溶性ビタミンの分離と同定に役立つことも示しています。ZORBAX Eclipse Plus カラムは、RR フォーマットを含む幅広いカラム寸法と粒子径で提供されています。これらのカラムは効率が高く、表面の不活性もきわめて高いため、この種の分離において、低いテーリングで優れた性能を得ることができます。カラム寸法は、採取するデータの使用目的に応じて選択できます。粒子径が小さい短いカラムでは、分析時間が大幅に短縮されるため、十分な分離能を維持しながら、メソッド開発のスピードとスループットを向上させることが可能です。

参考文献

1. Gerald F. Combs, Jr., *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, San Diego: Academic Press, 1998
2. Jian-Ping Yuan and Feng Chen, "Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution," *J. Agric. Food Chem.*, 46 (12), 5078–5082, 1998
3. Sam A. Margolis and Edward Park, "Stability of Ascorbic Acid in Solutions Stored in Autosampler Vials," *Clinical Chemistry*, 47, 1463–1464, 2001
4. Lloyd R. Snyder, Joseph L. Glajch, and Joseph J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., Wiley, New York, USA, 1997
5. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP 31 NF 26, May 1, 2008

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

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損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
August 6, 2008
5989-9313JAJP