

# Application News

## No.L438

高速液体クロマトグラフィー  
High Performance Liquid Chromatography

### “Co-Sense for Impurities” を利用した ビタミン D<sub>3</sub> の LC/MS/MS 分析

LC/MS/MS Analysis of Vitamin D<sub>3</sub> by “Co-Sense for Impurities”

“Co-Sense for Impurities” は、微量成分分析のための前処理を自動化するシステムで、アプリケーションニュース No.L424 ではシステムの概要および濃縮による高感度検出例をご紹介しました。本システムは濃縮や夾雑成分の除去を行うため、1次分離、濃縮、2次分離の3流路から構成されています。各流路で移動相やカラムを選択できるため、1次

分離においては分離に有利な条件を設定し、2次分離では検出に適した条件を設定するという組み合わせも可能となります。今回は、このような方法を利用してカプセル剤中のビタミン D<sub>3</sub> を LC/MS/MS にて分析した例をご紹介します。

K. Yamabe K. Sonomura

#### ■標準品の分析

##### Analysis of Standard

ビタミン D<sub>3</sub> は、順相分析用の高速分析カラム “Shim-pack XR-SIL” に導入して1次分離し、トラップカラム “Shim-pack MAYI-ODS” に濃縮した後、逆相分析用の高速分析カラム “Shim-pack XR-ODS II” で2次分離して質量分析計により検出しました。Table 1 に各工程の分析条件を示します。

1次分離で得られるクロマトグラムはUV検出器 (A) でモニタし、標準品によりピークの溶出位置を確認しました。ピーク前後の時間を Co-Sense for Impurities の制御ソフトウェアに設定して分析を開始すると、その画分は Fig. 1 のバルブ A の切替によりポンプ II の液と混合されるとともにトラップカラム (II) に濃縮されます。(Fig. 1, Fig. 2 の上図)

続いて Fig. 1 のバルブ B の切替を行い、成分の溶出と質量分析計 (検出器 B) のデータ収集を開始します。(Fig. 1, Fig. 2 の下図)

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

[Column I ]	: Shim-pack XR-SIL (75 mm L. x 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: n-Hexane/2-Propanol (100 / 1)
Flow Rate	: 0.4 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 5 μL
Detection (A)	: UV265 nm
[Column II ]	: Shim-pack MAYI-ODS (30 mm L. x 4.6 mm I.D., 50 μm)
Mobile Phase	: Water
Flow Rate	: 30 mL/min 2.55-3.2 min
[Column III ]	: Shim-pack XR-ODS II (75 mm L. x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A; Methanol / Water (100 / 5), B; Ethanol
Time Program	: B Conc 0 % (0-4 min) → 100 % (4.01-5 min) ·Mixer : 20 μL
Flow Rate	: 0.4 mL/min
Detection (B)	: LCMS-8030 (APCI positive, MRM 385.00>259.25)

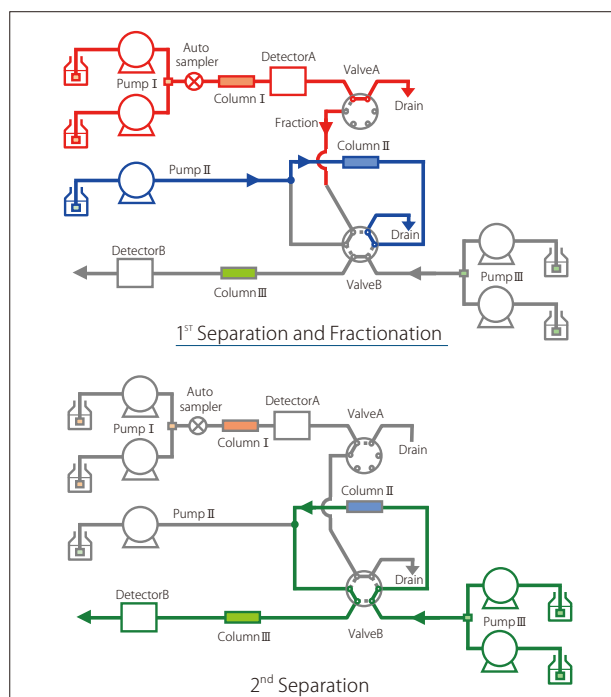


Fig. 1 流路図  
Flow Diagram

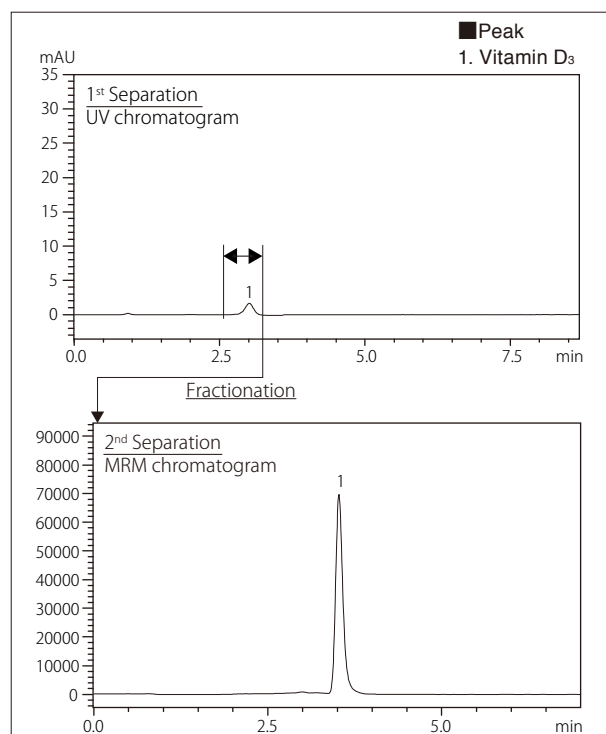


Fig. 2 ビタミン D<sub>3</sub> のクロマトグラム  
Chromatograms of Vitamin D<sub>3</sub>

以上の全工程で、1分析サイクルは約9分となりました。  
1次分離に用いた順相分析系ではLC/MS検出は不利ですが、2次分離の逆相分析系では良好に検出することができました。0.005-0.5 µg/mLにおける検量線直線性ではR>0.999が得られました。

また標準溶液(0.5 µg/mL)の6回繰り返し注入において、MRMクロマトグラムで得られたピークの面積再現性は1.55 %RSDでした。Fig. 3にクロマトグラムを示します。

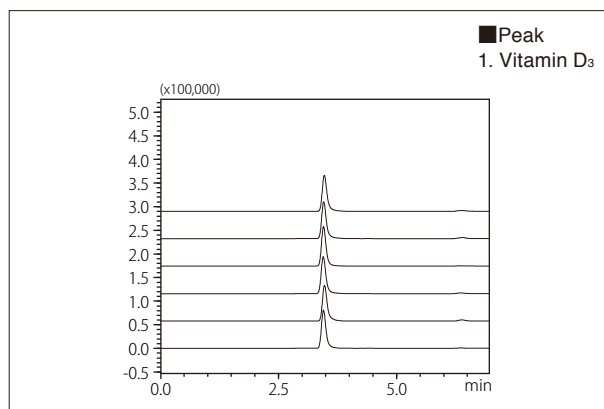


Fig. 3 MRMクロマトグラムの再現性  
Repeatability of MRM chromatograms

## ■カプセル剤中ビタミンD<sub>3</sub>の分析

### Analysis of Vitamin D<sub>3</sub> in Vitamins Capsules

この条件で、市販のカプセル剤の測定を行いました。  
市販脂溶性ビタミン剤は、カプセルの油状内容物をヘキサンに溶解しました。また市販のマルチビタミンのサプリメントについては、カプセルの内容物をDMSO/ヘキサン混液に溶解し加熱後、ヘキサン抽出しました。  
これらのヘキサン溶液をCo-Sense for Impuritiesシステ

ムに注入して得られた結果をFig. 4およびFig. 5に示します。  
いずれの場合も、上段のUVクロマトグラムが示すようにヘキサン溶液中に多量に含まれる夾雑成分は1次分離においてすみやかに排出し、ビタミンD<sub>3</sub>と少量の夾雑成分を含む微小画分のみを選択的に2次分離流路側に導入することが可能でした。

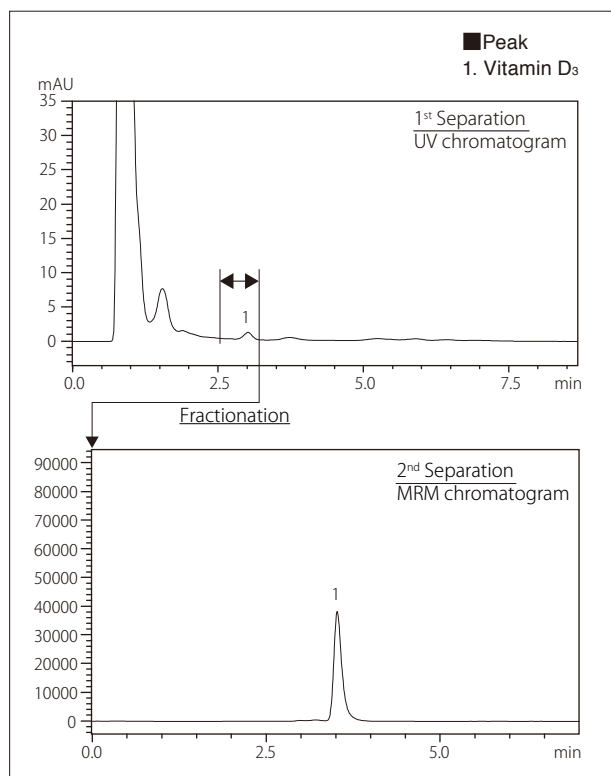


Fig. 4 市販ビタミン剤(カプセル)のクロマトグラム  
Chromatograms of Oil Soluble Vitamins Capsules

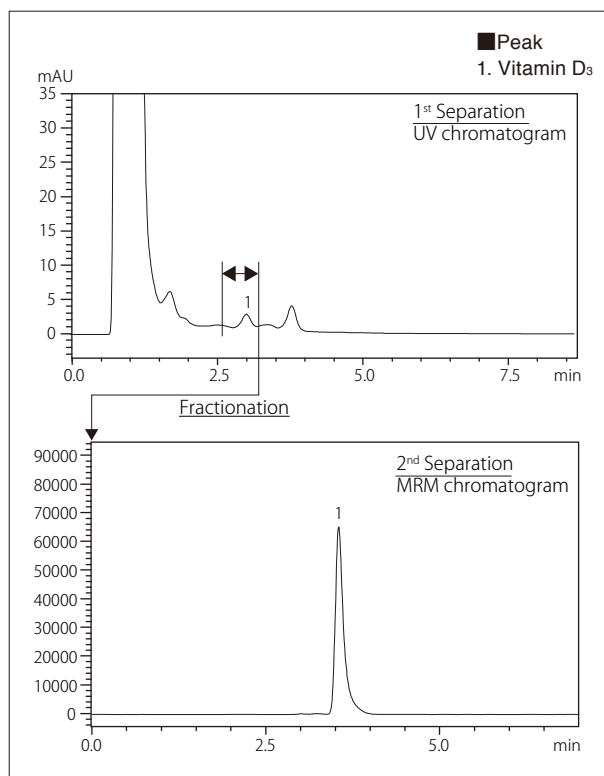


Fig. 5 市販マルチビタミン(カプセル)のクロマトグラム  
Chromatograms of Oil- and Water-Soluble Vitamins Capsules