

Application News

No. C191

超臨界流体クロマトグラフィー

Nexera™ UC 超臨界流体クロマトグラフを用いた脂溶性ビタミン類の分析

ビタミンは生体の機能を正常に維持するために必須の微量栄養素ですが、十分に体内で合成されないため食物より摂取する必要があります。体内でビタミンが欠乏することにより疾病や成長障害などの欠乏症状が現れます。ビタミンAは夜盲症・皮膚の異常、ビタミンDはくる病・骨軟化症、ビタミンEは貧血・血行障害、ビタミンKは出血・骨粗しょう症等と関係があります。したがって、食品やサプリメント中の脂溶性ビタミン類を精度よく分析することは非常に重要です。脂溶性ビタミン類はその化学構造と生理作用からビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKに大別されます。異性体も多いため脂溶性ビタミン分析では、良好な分離が求められます。

ここでは分離に超臨界流体クロマトグラフ (SFC) を、検出にトリプル四重極型質量分析計を用いた脂溶性ビタミン類の一斉分析例をご紹介します。

H. Terada, T. Hattori

■ 対象成分と分析条件

今回対象とした脂溶性ビタミン類とその関連物質、MSのMRM条件を表1に示します。また、SFCの分析条件を表2に示します。各脂溶性ビタミン類の濃度が1 μmol/Lの標準試料を分析したクロマトグラムを図1に示します。

表1 対象成分およびMRM条件

No.	Compumnds	MRM Transtion	classification
1	Retinol	ESI (+) 269.30>93.00	Vitamin A
2	Retinal	ESI (+) 285.20>161.00	
3	Retinoate	ESI (+) 301.20>122.90	
4	beta-Carotene	ESI (+) 536.60>444.00	Precursor of Vitamin A
5	Ergocalciferol (Vitamin D2)	ESI (+) 397.50>107.10	Vitamin D
6	Cholecalciferol (Vitamin D3)	ESI (+) 384.80>367.10	
7	Calcidiol (25(OH)D3)	ESI (+) 401.40>383.00	
8	Calcitriol (1,25-(OH)2D3)	ESI (+) 399.30>398.80	
9	25-Hydroxyergocalciferol (25(OH) D2)	ESI (+) 412.80>395.00	
10	1-alpha-25-Dihydroxyergocalciferol (1,25-(OH)2D2)	ESI (+) 411.40>134.80	
11	alpha-Tocopherol	ESI (+) 430.80>164.80	Vitamin E
12	beta-Tocopherol	ESI (+) 416.80>151.00	
13	gamma-Tocopherol	ESI (+) 416.80>150.80	
14	delta-Tocopherol	ESI (+) 402.80>136.80	
15	alpha-Tocotrienol	ESI (+) 424.80>164.80	
16	gamma-Tocotrienol	ESI (+) 410.80>150.80	
17	delta-Tocotrienol	ESI (+) 396.80>136.80	Vitamin K
18	alpha-Tocopherolquinone	ESI (+) 429.20>165.15	
19	Phylloquinone (Vitamin K1)	ESI (+) 451.40>186.80	
20	Menaquinone (Vitamin K2)	ESI (+) 445.30>186.80	

表2 分析条件

Column	: Shim-pack™ UC-RP (150 mm L.×2.1 mm I.D., 3 μm)
Mobile phase	: A; CO ₂ B; 0.1 % (w/v) Ammonium formate in methanol
Gradient	: B.conc. 5 % (0 min) - 10 % (6 min) - 30 % (10 min) - 50 % (10.1-15 min) - 5 % (15.1-18 min)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Column temp.	: 40 °C
BPR pressure	: 10 MPa
Detector	: LCMS™-8050 (ESI, MRM mode)
Makeup	: 0.1 % (w/v) Ammonium formate in methanol
Makeup flow rate	: 0.05 mL/min
Injection vol.	: 1 μL

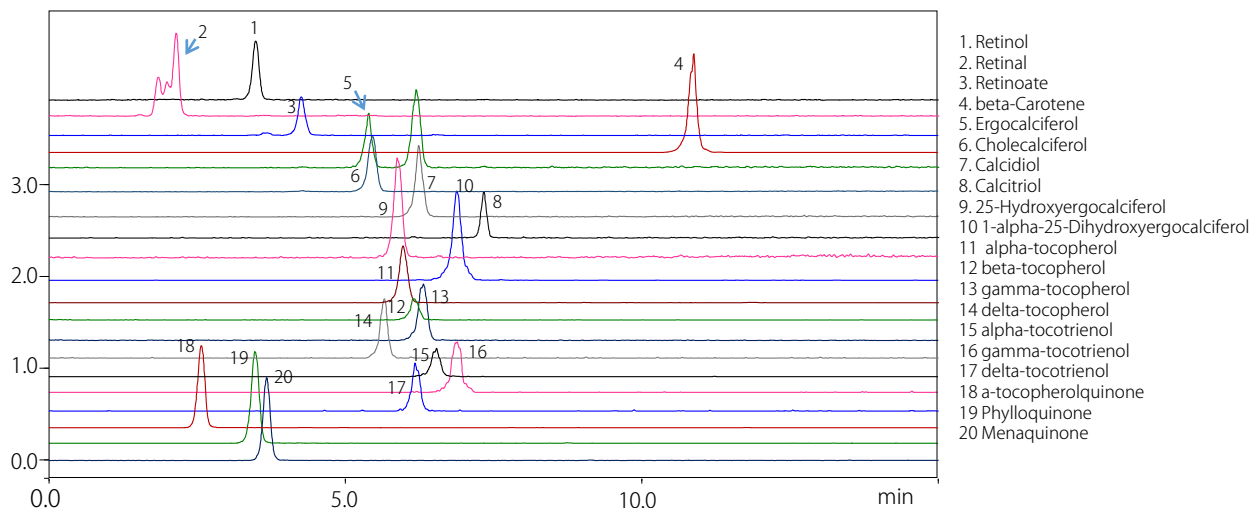


図1 標準溶液のクロマトグラム (各 1 μmol/L)

■ 検量範囲と感度

表3に各脂溶性ビタミン類の濃度が0.01~10 μmol/Lの標準試料を分析し得られた検量線と検出限界の情報を示します。

表3 直線性および検出限界

Compounds	Concentration (μmol/L)	R ²	LOD (nmol/L)
Retinol	0.01-10	0.9997	20
Retinal	0.01-10	0.9993	9.1
Retinoate	0.01-10	0.9964	14
beta-Carotene	0.01-10	0.9986	0.40
Ergocalciferol	0.05-10	0.9993	47
Cholecalciferol	0.01-10	0.9953	15
Calcidiol	0.01-10	1.0000	24
Calcitriol	0.05-10	0.9988	25
25-Hydroxyergocalciferol	0.01-10	0.9988	17
1-alpha-25-Dihydroxyergocalciferol	0.01-10	0.9995	0.80
alpha-Tocopherol	0.01-10	0.995	2.2
beta-Tocopherol	0.01-10	0.9973	16
gamma-Tocopherol	0.01-10	0.9992	32
delta-Tocopherol	0.02-10	0.9988	12
alpha-Tocotrienol	0.01-5	0.9988	1.1
gamma-Tocotrienol	0.02-10	0.9999	8.3
delta-Tocotrienol	0.01-10	0.9983	4.3
alpha-Tocopherolquinone	0.01-10	0.9971	0.90
Phylloquinone	0.01-10	0.9991	2.3
Menaquinone	0.01-10	0.9983	4.8

* beta-Carotene のみ 2 次近似

■ 再現性

表4に各脂溶性ビタミン類の濃度が1 μmol/Lの標準試料を6回繰り返し分析し得られた保持時間とピーク面積の再現性を示します。

表4 再現性

Compounds	Retention time		Peak area	
	(min)	RSD(%)	Average	RSD(%)
Retinol	3.485	0.112	512700	3.72
Retinal	2.149	0.365	730359	3.99
Retinoate	4.270	0.307	374720	2.71
beta-Carotene	10.882	0.114	15022154	2.74
Ergocalciferol	5.376	0.357	572484	3.24
Cholecalciferol	5.459	0.239	2113522	3.22
Calcidiol	6.237	0.0880	1898273	3.84
Calcitriol	7.324	0.202	378473	3.74
25-Hydroxyergocalciferol	5.902	0.219	1076576	3.36
1-alpha-25-Dihydroxyergocalciferol	6.883	0.197	2088882	4.83
alpha-Tocopherol	5.979	0.240	1137057	3.92
beta-Tocopherol	6.174	0.0820	283144	4.32
gamma-Tocopherol	6.308	0.138	411577	5.94
delta-Tocopherol	5.646	0.247	205092	2.24
alpha-Tocotrienol	6.531	0.394	343701	3.18
gamma-Tocotrienol	6.882	0.264	298561	3.62
delta-Tocotrienol	6.182	0.467	192646	2.61
alpha-Tocopherolquinone	2.583	0.371	7867923	3.94
Phylloquinone	3.485	0.300	2055829	3.76
Menaquinone	3.678	0.336	1637582	2.17

■ サプリメント中の脂溶性ビタミン類の分析

図2にビタミンDとビタミンKが含まれるサプリメントの抽出液を分析したクロマトグラムを示します。サプリメントは粉碎して、n-ヘキサンで抽出を行い、遠心分離後にメンブランフィルタでろ過しました。同サンプルからCholecalciferolとMenaquinoneが検出されました。抽出液に1 μmol/L相当のCholecalciferolとMenaquinoneを標準添加し、回収率を確認した結果を表5に示します。両成分とも良好な回収率が得られました。

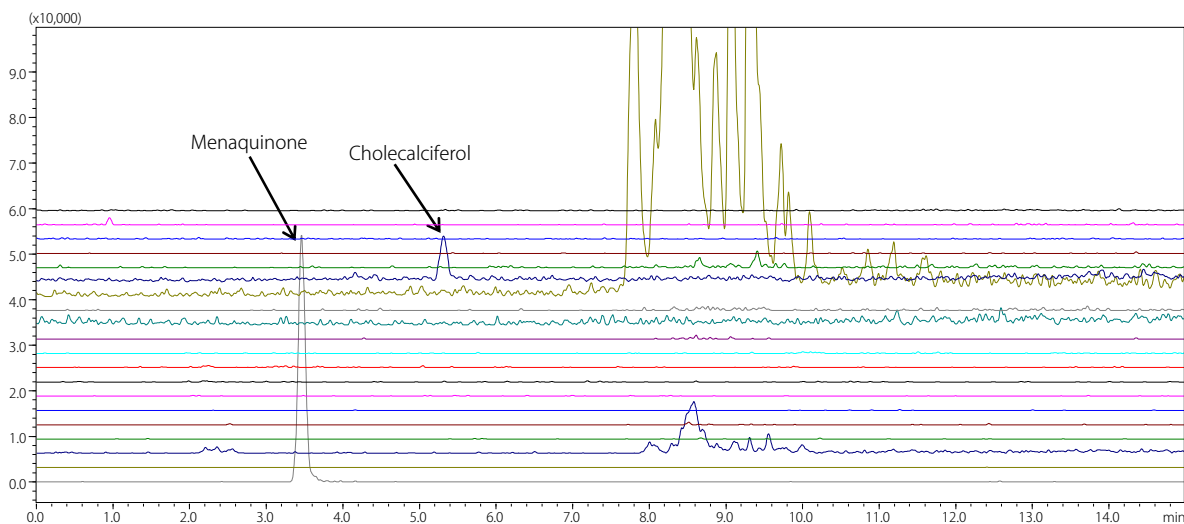


図2 サプリメント抽出液のクロマトグラム

表5 添加回収試験結果

濃度 (μmol/L)	成分	Cholecalciferol	Menaquinone
	1 μmol/L 相当添加	未添加	0.05
1 μmol/L 相当添加		1.109	1.062
回収率 (%)		106	94.6

Nexera、Shim-pack、およびLCMSは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年3月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。