

## トリプル四重極質量分析計を用いた 飲料中の脂溶性ビタミン一斉分析

前島 希

### ユーザーベネフィット

- ◆ 脂溶性ビタミン13化合物の一斉分析が可能です。
- ◆ トリプル四重極質量分析計を用いて高感度に分析できます。
- ◆  $\alpha$ -カロテンおよび $\beta$ -カロテンの個別定量が可能です。

### はじめに

ビタミンは身体の機能を正常に保つ働きを担いますが、体内でほとんど合成できないため食物から摂取する必要があります。中でも水に溶けにくい性質を持つビタミンA、D、E、Kは脂溶性ビタミンと呼ばれます。ビタミンAは主にレチノールを指します。レチノールは目や皮膚を健康に保つたり、抵抗力を強めたりする働きを持ちます。一方、 $\alpha$ -カロテンや $\beta$ -カロテンは体内でレチノールに変換されるためプロビタミンAと呼ばれます。これらはレチノールへ変換される効率が異なり、 $\alpha$ -カロテンと $\beta$ -カロテンの生体利用率はそれぞれ1/24、1/12と見積もられています<sup>1)</sup>。ビタミンAの活性を調べるには $\alpha$ -カロテンと $\beta$ -カロテンの個別定量が必要です。これらは異性体であり構造が非常に類似しているため(図1)、従来のLC-MS/MS分析では分離が困難でした。

本稿では、LC条件を検討することにより $\alpha$ -カロテンと $\beta$ -カロテンの個別定量を実現した脂溶性ビタミンの一斉分析について紹介します。本メソッドを用いて野菜ジュース中の $\alpha$ -カロテンと $\beta$ -カロテンの個別定量および添加回収試験を行いました。 $\alpha$ -カロテンと $\beta$ -カロテンはエステル体が存在しないため、前処理のけん化処理を省略することが可能です。簡便な抽出操作で良好な回収率を得ることができました。

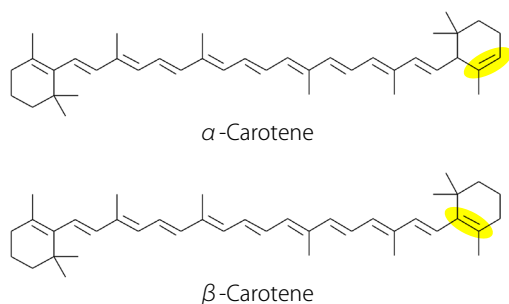


図1  $\alpha$ -カロテンと $\beta$ -カロテンの構造

### 前処理と分析条件

市販の野菜ジュース1 gをとり、無水硫酸ナトリウム5 gを加えました。これにエタノール10 mLを加え5分間振とう後、4,000xgで5分間遠心し、上清を回収しました。残った沈殿に対して上記抽出処理をさらに2回繰り返しました。回収した上清を合わせ、エタノールで40 mLに定容しました。抽出液をエタノールで100倍に希釈後、15,000 rpmで10分間遠心し、上清を抽出サンプルとしました。

分析はトリプル四重極質量分析計LCMS-8050および超高速液体クロマトグラフNexera™ X3を組み合わせたシステムで行いました。LC-MS/MS分析条件およびMRM条件を表1、表2に示します。

表1 LC-MS/MS分析条件

#### [HPLC conditions] (Nexera X3)

Column	: Kinetex XB-C18 (100 mm x 3.0 mm I.D., 1.7 $\mu$ m)
Mobile phase A	: Methanol
Mobile phase B	: Ethanol
Flow rate	: 0.5 mL/min
Gradient program	: B conc. 15% (0-7 min) - 100% (7.01-12 min) - 15% (12.01-14 min)
Column temp.	: 40°C
Injection volume	: 5 $\mu$ L

#### [MS conditions] (LCMS-8050)

Ionization	: APCI
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
DL temp.	: 200°C
Interface temp.	: 300°C
Heat block temp.	: 200°C

表2 MRM条件

Compound	Ret. Time (min)	Polarity	Transition	CE (V)
Retinol	1.16	+	269.20> 77.10	-53
$\alpha$ -Carotene	6.35	+	537.45>123.15	-21
$\beta$ -Carotene	6.71	+	537.45>119.10	-39
$\beta$ -Cryptoxanthin	2.57	+	553.45>119.00	-33
Ergocalciferol	1.75	+	397.35> 69.00	-24
Cholecalciferol	1.80	+	385.35>259.20	-14
$\alpha$ -Tocopherol	1.98	-	429.30>163.10	30
$\beta, \gamma$ -Tocopherol	1.81	-	415.35>149.10	27
$\delta$ -Tocopherol	1.66	-	401.25>135.00	30
Phylloquinone	2.96	+	451.45>187.10	-27
Menaquinone-4	2.03	+	445.40>187.10	-22
Menaquinone-7	5.94	+	649.60>187.10	-30



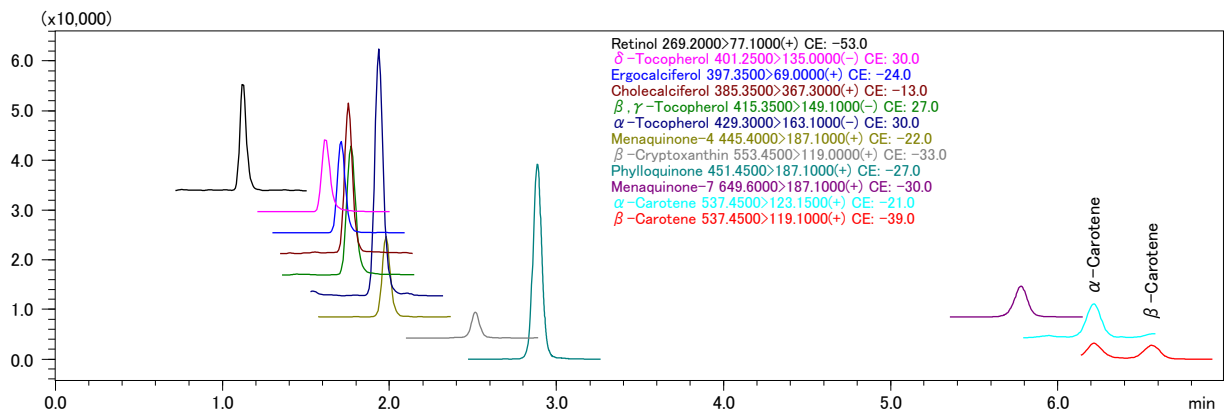


図2 脂溶性ビタミン13化合物の一斉分析

### ■ 脂溶性ビタミン13成分の一斉分析

代表的な脂溶性ビタミン13成分の標準品の定量範囲および再現性の結果を表3に、MSクロマトグラムを図2に示します。またα-カロテンとβ-カロテンの検量線を図3に示します。精度よく広範囲の定量が可能です。

表3 定量範囲および再現性

Compound	Quantification range (ng/mL)	Repeatability (% , N=5)	
		1 ppb	5 ppb
Retinol	0.1 - 1000	9.8	3.1
α-Carotene	0.5 - 1000	6.9	2.7
β-Carotene	0.5 - 500	8.5	3.7
β-Cryptoxanthin	0.5 - 1000	3.1	1.6
Ergocalciferol	0.1 - 1000	4.2	1.7
Cholecalciferol	0.5 - 1000	9.6	4.0
α-Tocopherol	0.5 - 1000	6.9	1.5
β, γ-Tocopherol	0.1 - 1000	2.0	3.8
δ-Tocopherol	0.1 - 1000	7.5	5.5
Phylloquinone	0.5 - 1000	3.3	1.7
Menaquinone-4	0.5 - 1000	9.5	2.9
Menaquinone-7	0.1 - 1000	3.2	2.0

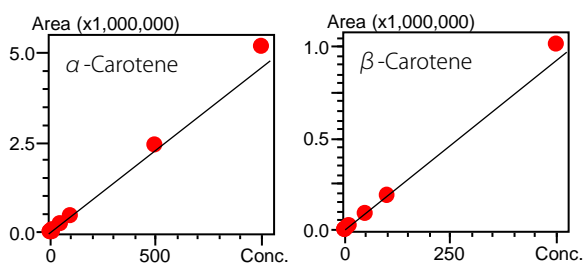


図3 α-カロテンとβ-カロテンの検量線

### ■ 野菜ジュース中のα-カロテンとβ-カロテンの定量

2種類の市販野菜ジュースについてα-カロテンおよびβ-カロテンの定量を行いました。結果を表4に示します。定量値はメーカーの示す栄養成分表示の範囲内となりました。

表4 野菜ジュース中のα-カロテンとβ-カロテン定量結果

Compound	Vegetable juice a (μg/mL beverage)	Vegetable juice b (μg/mL beverage)
α-Carotene	20.3	15.7
β-Carotene	40.5	56.3

### ■ α-カロテンとβ-カロテンの添加回収試験

2種類の市販野菜ジュースについて前処理で抽出した溶液にα-カロテンおよびβ-カロテンを添加し、イオンサプレッションの影響を確認しました。結果を表5、6に示します。いずれの野菜ジュースにおいてもα-カロテンおよびβ-カロテンで良好な回収率を得ました。

表5 野菜ジュースaにおける回収率 (%)

Compound	Spiked conc. (μg/mL in vial)		
	2	5	10
α-Carotene	96.8	98.7	103.1
β-Carotene	112.9	97.4	99.9

表6 野菜ジュースbにおける回収率 (%)

Compound	Spiked conc. (μg/mL in vial)		
	2	5	10
α-Carotene	103.0	109.6	108.3
β-Carotene	68.5	101.1	102.9

### ■ まとめ

13種類の脂溶性ビタミン一斉LC-MS/MS分析を行いました。本方法ではα-カロテンとβ-カロテンの個別定量が可能です。けん化処理を省略した簡便な前処理で市販野菜ジュース中のα-カロテンとβ-カロテンの定量を行いました。添加回収試験によりイオンサプレッションの影響を調べたところ、良好な回収率を得ました。

<参考文献>

- 1) 厚生労働省「日本人の食事摂取基準（2020年版）」

LCMSおよびNexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。