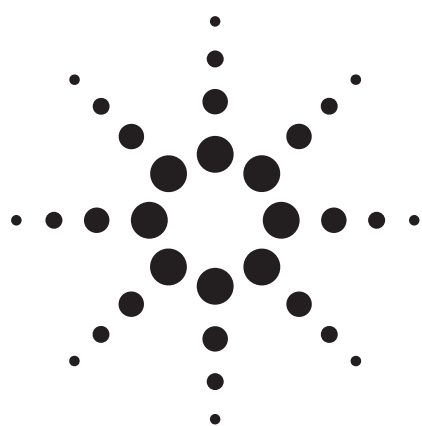


ラピッドレゾリューション LC/MS/MS による シリアル中の水溶性ビタミン B の分析



アプリケーション

食品分析

著者

Sheher Mohsin
Agilent Technologies, Inc.
Schaumburg, IL
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112-5910
USA

Indarpal Singh
ConAgra Foods, Inc.
Omaha, NE 68102
USA

要旨

Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計 (QQQ) を用いて、朝食シリアル中のさまざまな水溶性ビタミン B 化合物を分析しました。ラピッドレゾリューションハイスループット SB-Aq カラム (粒径 1.8 μm) を用いてシンプルなグラジエント溶出を行いました。すべての化合物は 7.5 分以内に溶出し、ピリドキシン以外は 0.5 ~ 500 ppb の 3 桁以上にわたる良好な直線性が得られました。また、0.5 ppb の低レベル濃度でも良好なピーク面積の再現性が示されました。

緒言

水溶性ビタミンは非常に極性が高く、逆相カラムでは保持されにくい物質です。移動相にヘプタフルオロ酪酸などのイオンペア試薬を用いると、これらの化合物の分離と保持を向上できます。しかし、イオンペア試薬の使用には、質量分析計でのバックグラウンドレベルの上昇という欠点があります。そのため、親水性化合物を保持するように設計された結合相のカラムを使用して、移動相溶媒にギ酸アンモニウムを用いた迅速で高感度なメソッドを開発しました。

この分析に使用した Agilent 1200 シリーズ液体クロマトグラフィ (LC) システムは、サブ 2 ミクロン粒子カラムを利用し、迅速かつ高分離な分析を実現するために開発されました。ディレイボリュームの削減、圧力範囲の拡大、カラム使用上限温度の上昇といった特長があります。この LC システムを、G1948B エレクトロスプレーイオン源を持つ Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計 (QQQ) に接続しました。分離は、ギ酸アンモニウムを含む水/メタノール溶液グラジエントを用いて、ZORBAX AQ 1.8 ミクロンカラムで行いました。

水溶性ビタミンの標準的な LC/MS メソッドは、移動相溶媒にヘプタフルオロ酪酸イオンペア試薬を用い、分析時間は 30 分程度です。我々は 60 MPa 耐圧の高性能 1.8 μm カラムを用いることで、10 分程度の短いサイクルタイムでスクリーニングと定量を可能にする迅速な分析メソッドを開発しました。ピリドキシン以外のすべて



Agilent Technologies

の測定対象化合物について、0.5 pg/μL の定量下限範囲で 3 桁にわたる直線性が得られました。ピリドキシンでは、優れた感度が実証されましたが、直線性は 3 桁未満となりました。0.5 ~ 250 pg/μL のピリドキシンを除き、

すべての化合物に対して 0.5 ~ 500 pg/μL のビタミンの検量線とクロマトグラムを作成しました。

ビタミン B の構造式は以下のとおりです。

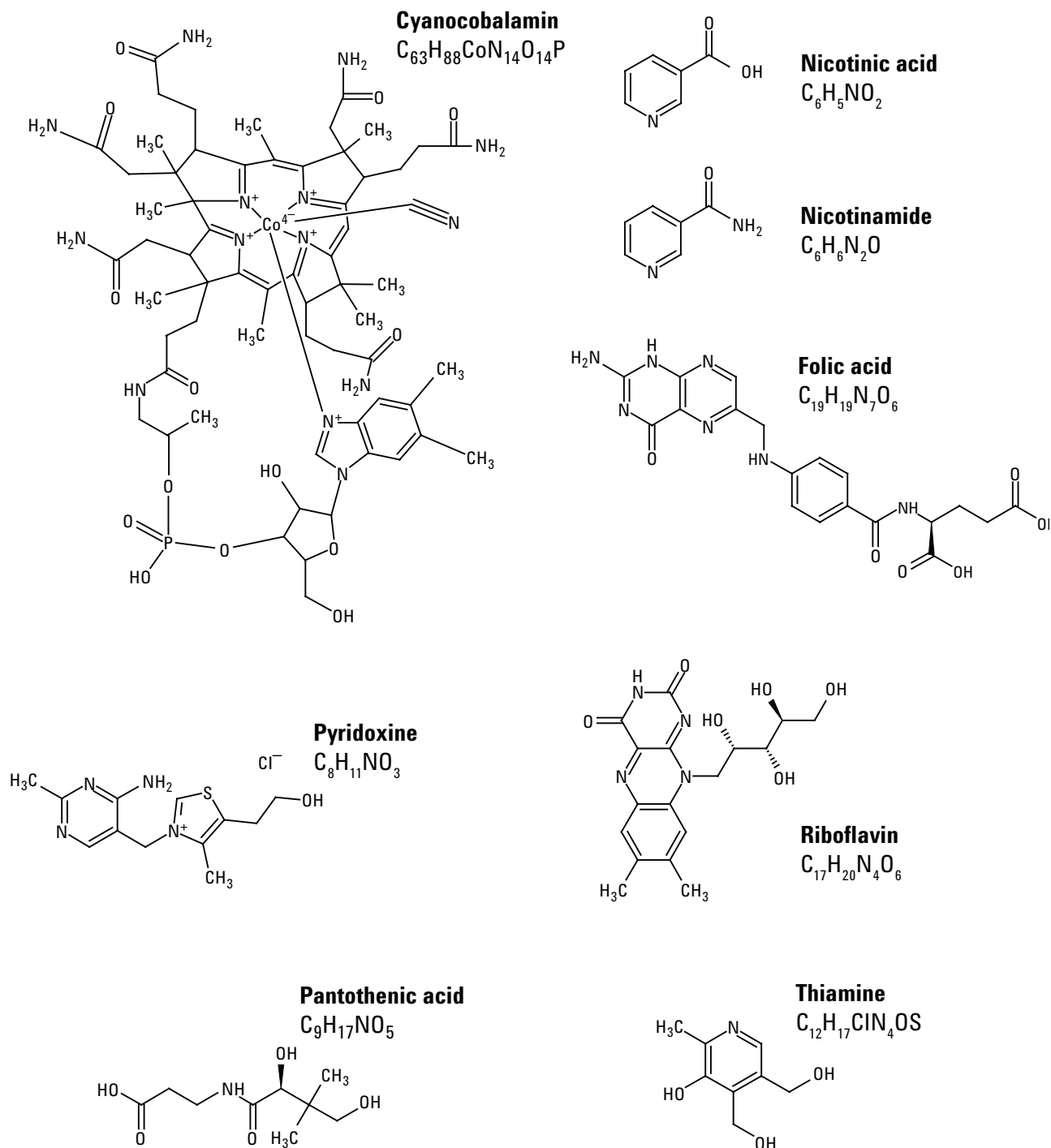


図 1. ビタミン B の構造式

実験

サンプル前処理

全 8 種類の化合物の標準混合液（メタノール溶液）は ConAgra Foods から提供されました。20 mM ギ酸アンモニウムと 0.1% ギ酸を含む水/メタノール (90:10) 溶液で 500、250、100、50、5、0.5 pg/μL の濃度に調整しました。この溶液を未知サンプルの定量に使用しました。

1 種類のビタミン B 強化サンプルは、以下の前処理手順を用いて用意しました。

1. ミキサーで朝食用シリアルを粉碎し、均質化します
2. 均質化したサンプル 1 g を 50 mL バイアルに秤量します
3. 0.1 M HCl 25 mL を加え、水槽で 100 °C、20 分間加熱し、これによりビタミンを溶解します。

4. 室温まで冷却します

5. 脱イオン水で容量を 1 L に調整します

6. 0.45 μm ガラス製のマイクロファイバーメンブレンでろ過します

使用した強化サンプルは、お客様へのデモを目的に、機器の感度をテストするために作成されたものです。標準的な強化されていないサンプル抽出物は、抱合形態から天然ビタミンを開放するための酵素消化により処理された均質化サンプル 1 g から構成され、この研究で分析された強化サンプルで使用される 1/100 の容量である 10 mL に容量調整されます。高濃度では、塩とその他のマトリックスが一部のビタミンの分析の干渉の原因になります。結果として、これらのサンプルでは、マトリックス効果を調整するために、さらに希釈したほうがよい場合があります。

表 1. MRM モードパラメータ

セグメント	化合物	トランジション	フラグメンター (V)	衝突エネルギー (V)
1	チアミン	265.2 > 122.0	85	10
	パントテン酸	220.2 > 90.0	110	13
	ピリドキシン	170.1 > 152.1	100	10
	ニコチン酸	124.1 > 80.0	100	27
	ニコチンアミド	123.1 > 80.0	100	25
2	シアノコバラミン	678.6 > 146.7	130	35
	葉酸	442.2 > 295.1	120	10
	リボフラビン	377.2 > 243.1	110	25

LC/MS メソッド詳細

LC 条件

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ、デガッサ、ウェルプレートサンブラ、カラム恒温槽

カラム: Agilent ZORBAX RRHT SB-Aq, 3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm (PN: 828975-314)

カラム温度: 35 °C

移動相: A = 20 mM ギ酸アンモニウムと 0.1% ギ酸水溶液

B = 20 mM ギ酸アンモニウムと 0.1% ギ酸メタノール溶液

流量: 0.5 mL/min

注入量: 10 μL

グラジエント: 時間 (分) %B
 0.0 10
 8.0 55 ストップタイム: 10 分
 8.1 10

ニードル洗浄: 75:25 メタノール/水 (フラッシュポート 20 秒)

MS 条件

モード: Agilent G1948B イオン源を用いたポジティブ ESI

ネブライザ: 30 psig

乾燥ガス流量: 10 L/min

乾燥ガス温度: 350 °C

V_{cap}: 1,850 V

分解能 (FWHM): Q1 = 低分解能、Q2 = 低分解能

すべての MRM トランジションのデュエルタイム 200 msec

シアノコバラミンのプリカーサイオン (m/z 678.6) は、図 1 に示した組成式 $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ の予想値の半分です。この化合物の構造は不安定であるため、イオン化プロセス中に開裂するものと思われます。

結果と考察

全 8 種類の化合物の検量線を図 2A ~ 2H に示します。良好な直線性を得るために、ピロキシジンの場合だけ、500 ppb を除きました。内部標準は含まれていません。

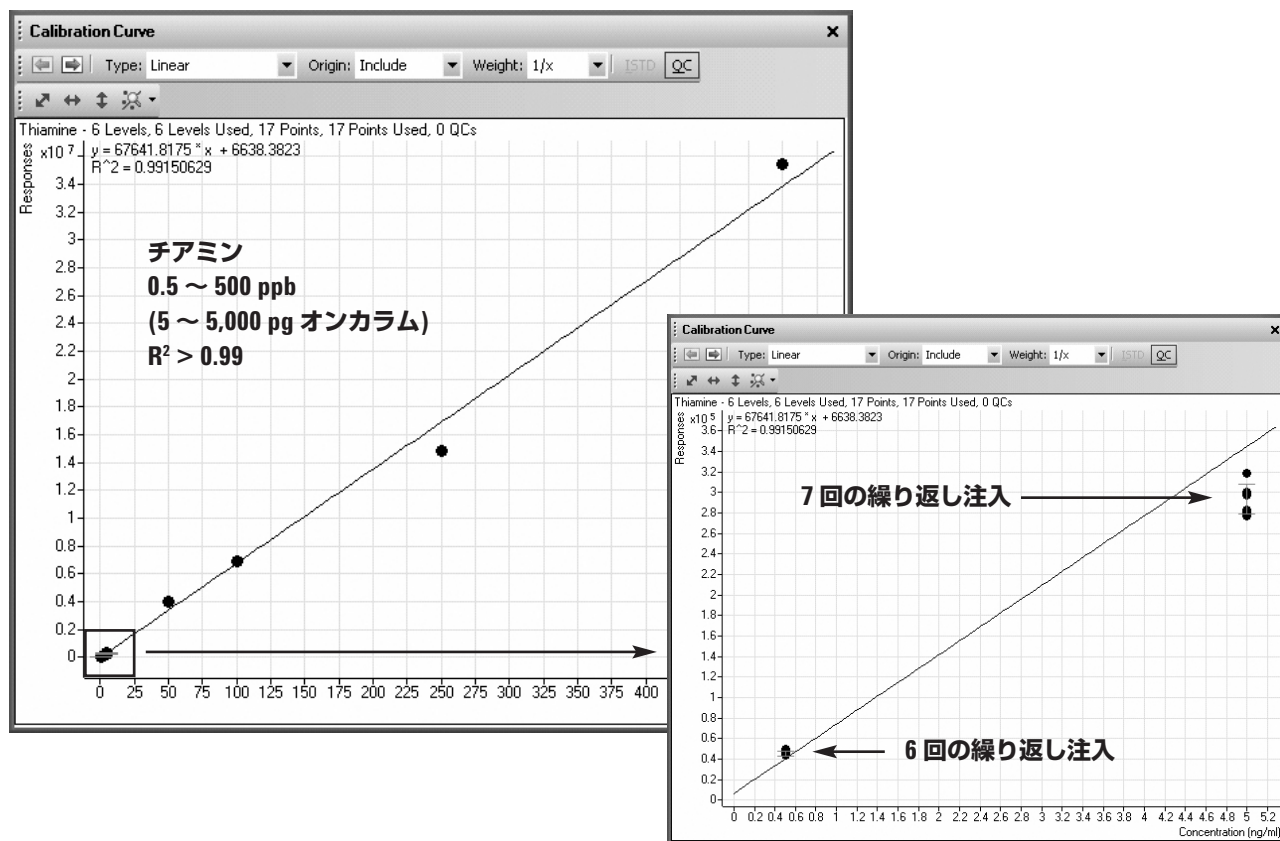


図 2A. 3 桁にわたるチアミンの直線性

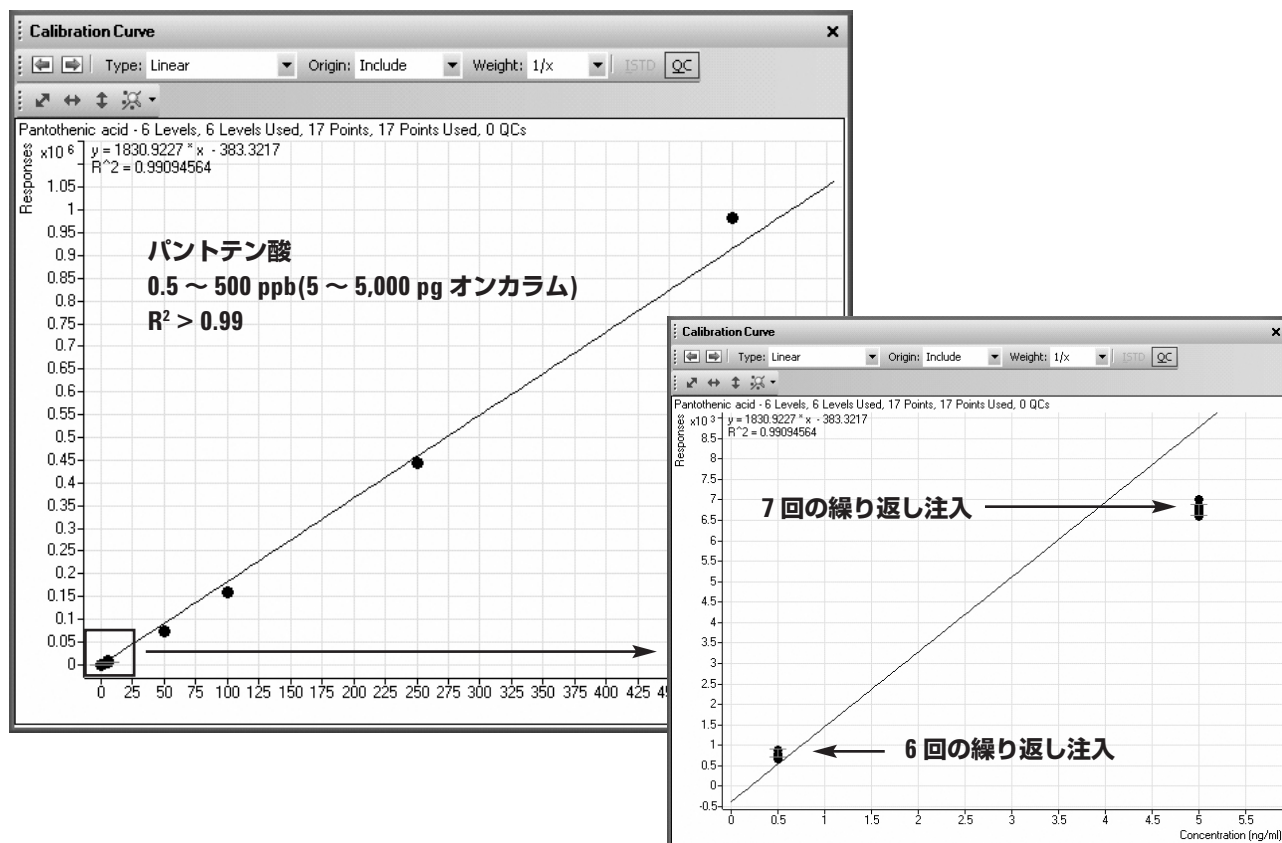


図 2B. 3桁にわたるパントテン酸の直線性

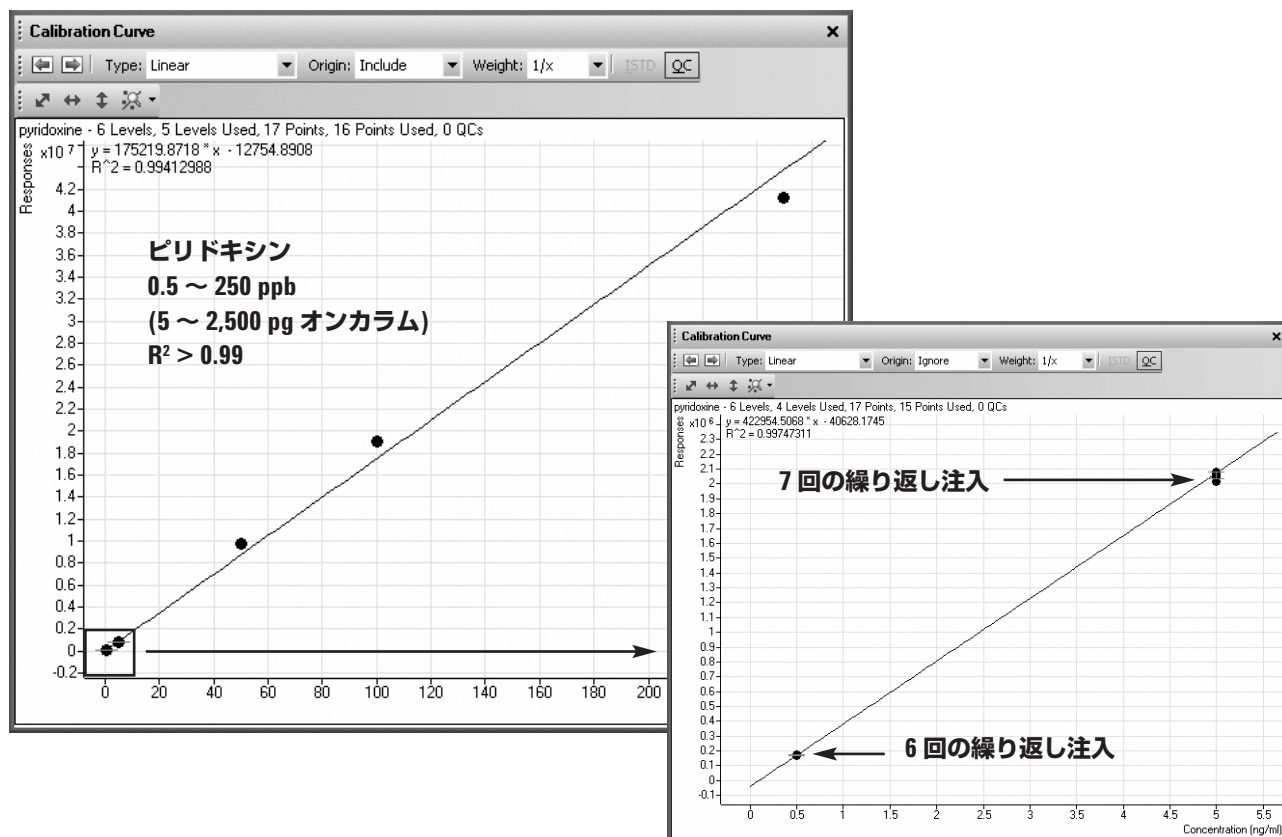


図 2C. ほぼ 3桁にわたるピリドキシンの直線性

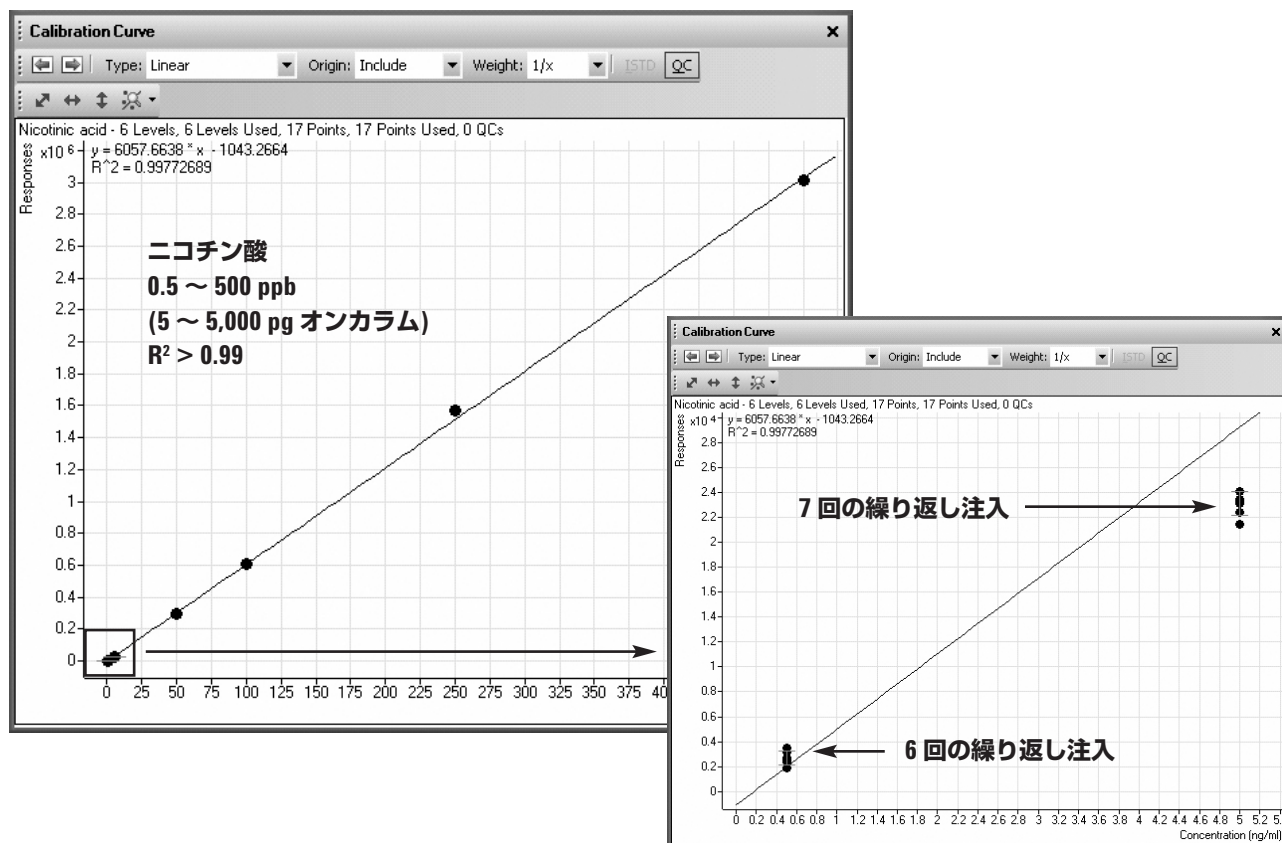


図 2D. 3 桁にわたるニコチン酸の直線性

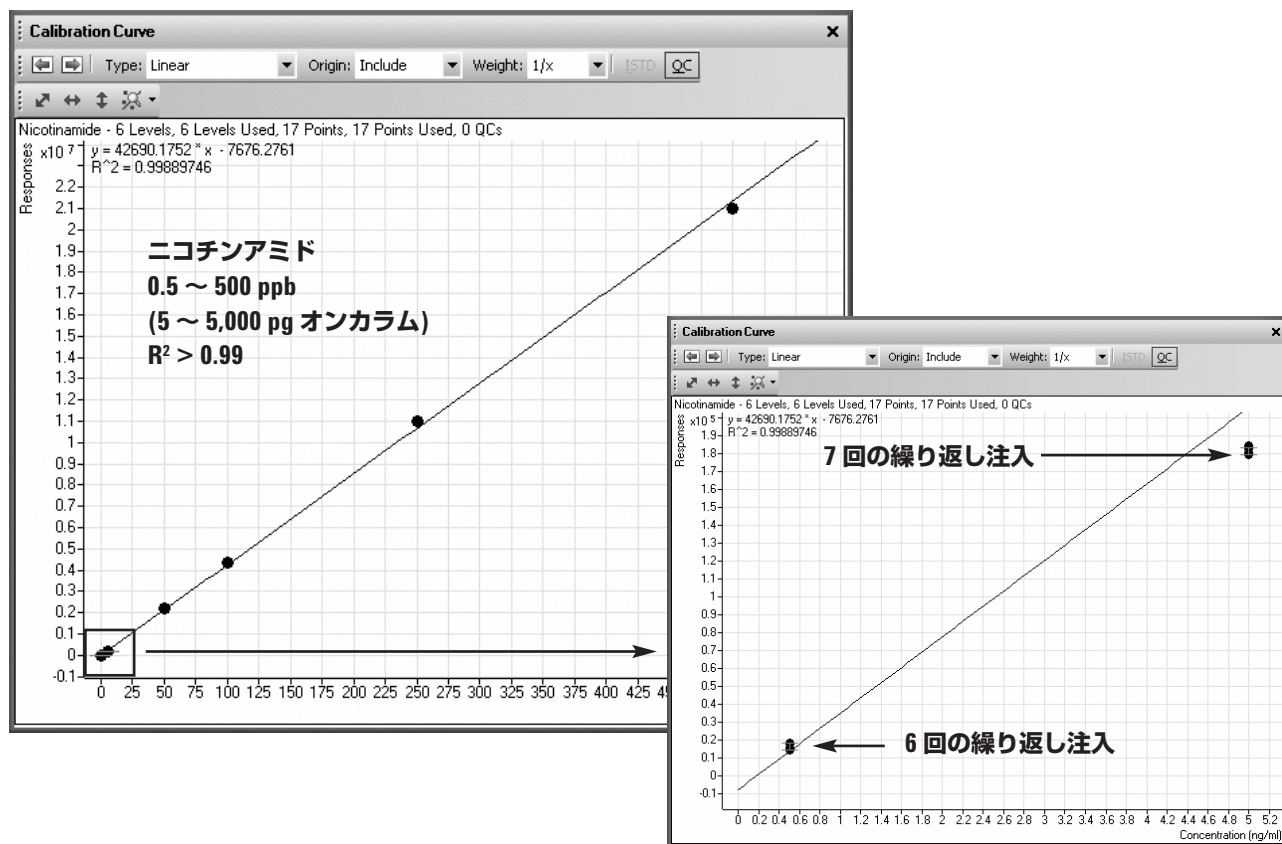


図 2E. 3 桁にわたるニコチンアミドの直線性

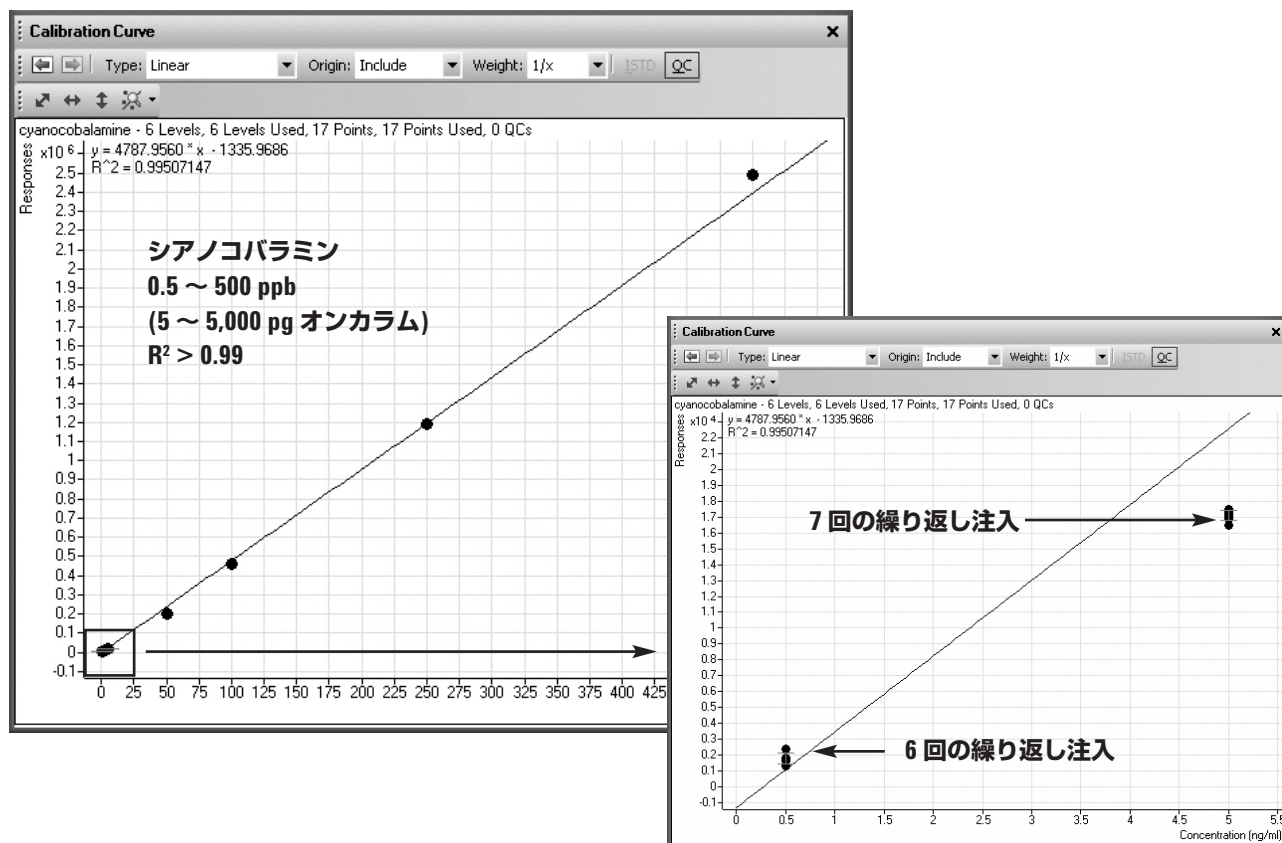


図 2F. 3桁にわたるシアノコバラミンの直線性

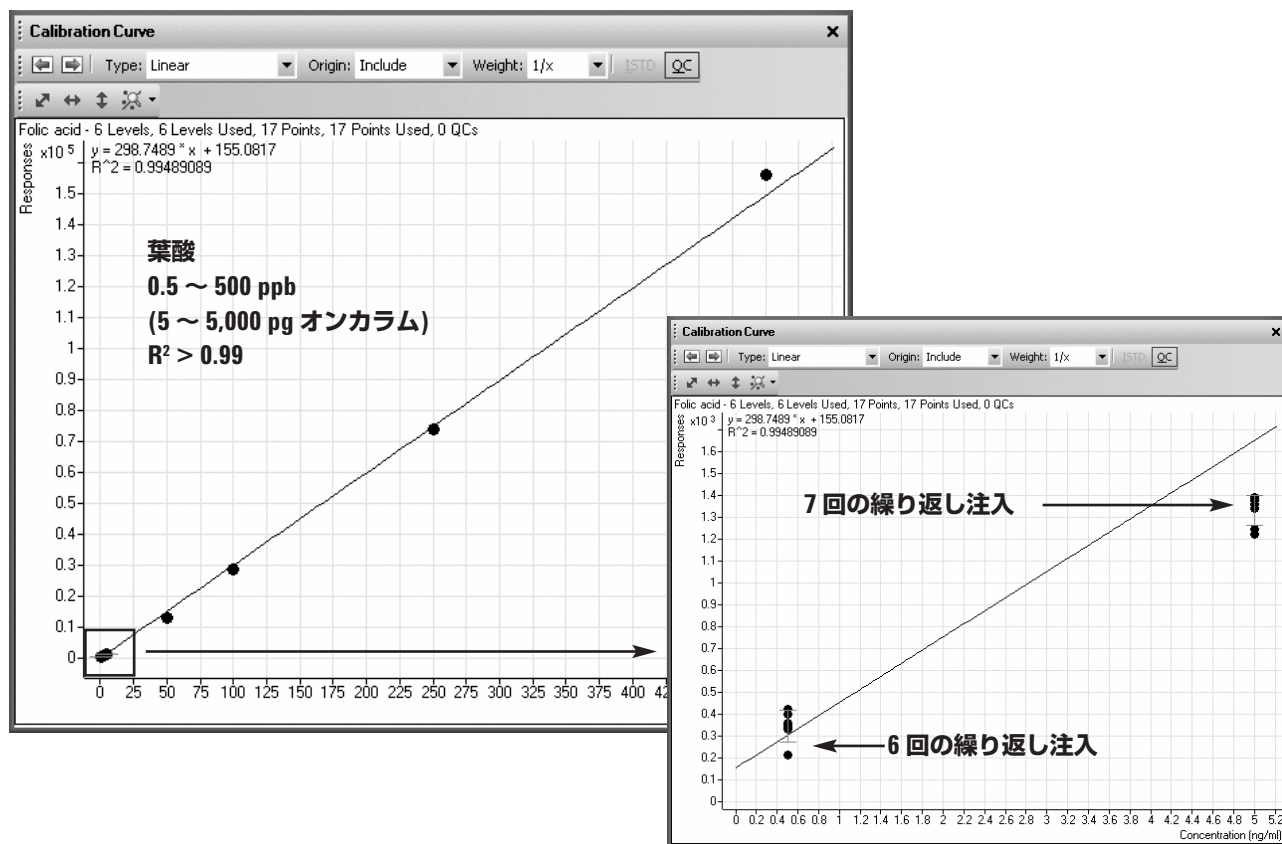


図 2G. ほぼ3桁にわたる葉酸の直線性

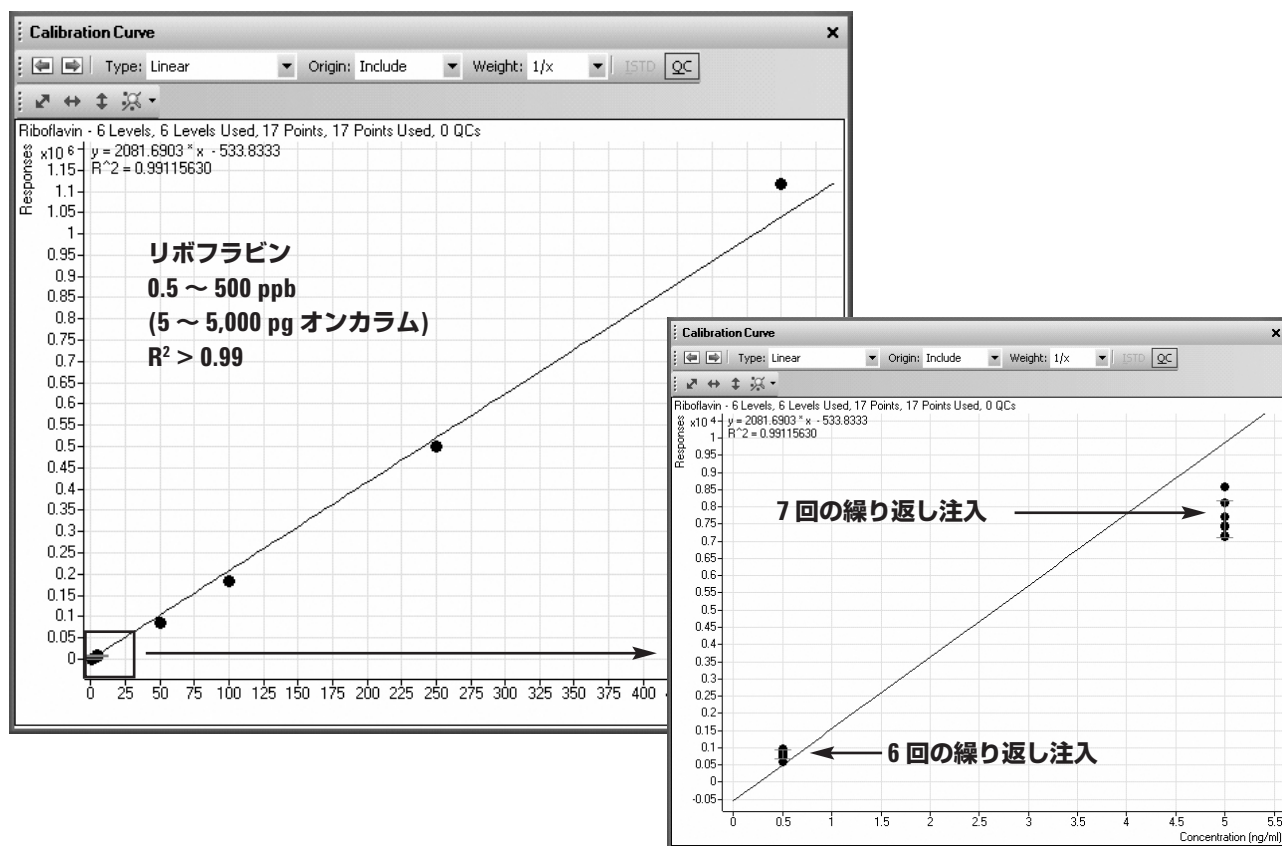


図 2H. 3 桁にわたるリボフラビンの直線性

データに対するすべての直線近似は、原点を通らない、 $1/x$ の重み付けされた直線として示されています。

ピリドキシンの 0.5 ppb 濃度での再現性を図 3 に示します。表 2 に 0.5 ppb 濃度でのすべての化合物のピーク面積 %RSD 値を示します。

表 2. 0.5 ppb の最低定量濃度での各化合物のピーク面積再現性

化合物	ピーク面積 %RSD
チアミン	5.6
パントテン酸	11.6
ピリドキシン	2.6
ニコチン酸	12.9
ニコチンアミド	10.1
シアノコバラミン	19.4
葉酸	13.4
リボフラビン	17.1

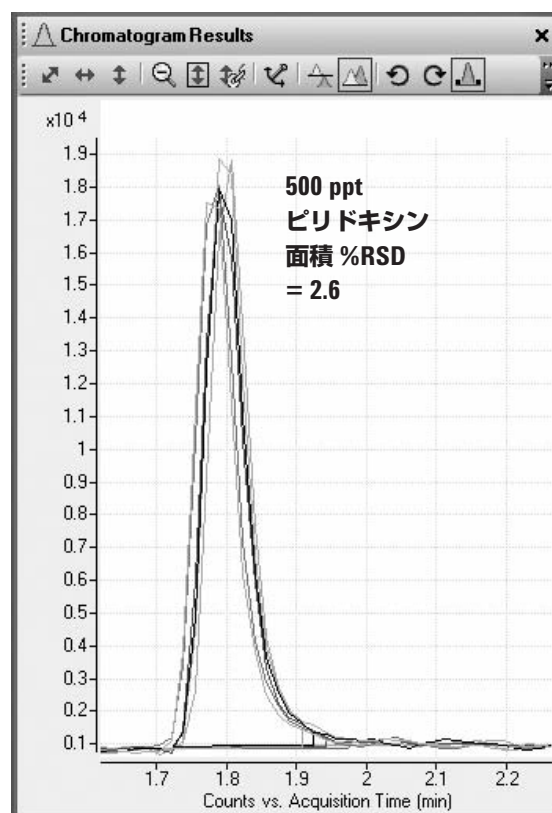


図 3. 500 ppt 濃度でのピリドキシンのピーク面積再現性、6 回注入

強化シリアル抽出物も、前述した標準混合液を用いて分析および定量を行いました。MassHunter 定量分析の結果を図 4 に示します。サンプル中に存在するニコチンアミドの濃度は 111.6 pg/μL であると計算されました。

強化抽出物中のすべての化合物の濃度を表 3 に示します。

強化サンプル抽出物中の 8 種類の化合物のクロマトグラムを図 5 に示します。

表 3. 強化シリアル抽出物中の各化合物の濃度

化合物	計算濃度 (pg/μL)
チアミン	24.0
パントテン酸	1.2
ピリドキシン	15.5
ニコチン酸	43.5
ニコチンアミド	111.6
シアノコバラミン	0.4*
葉酸	2.6
リボフラビン	8.6

* 定量下限の範囲外

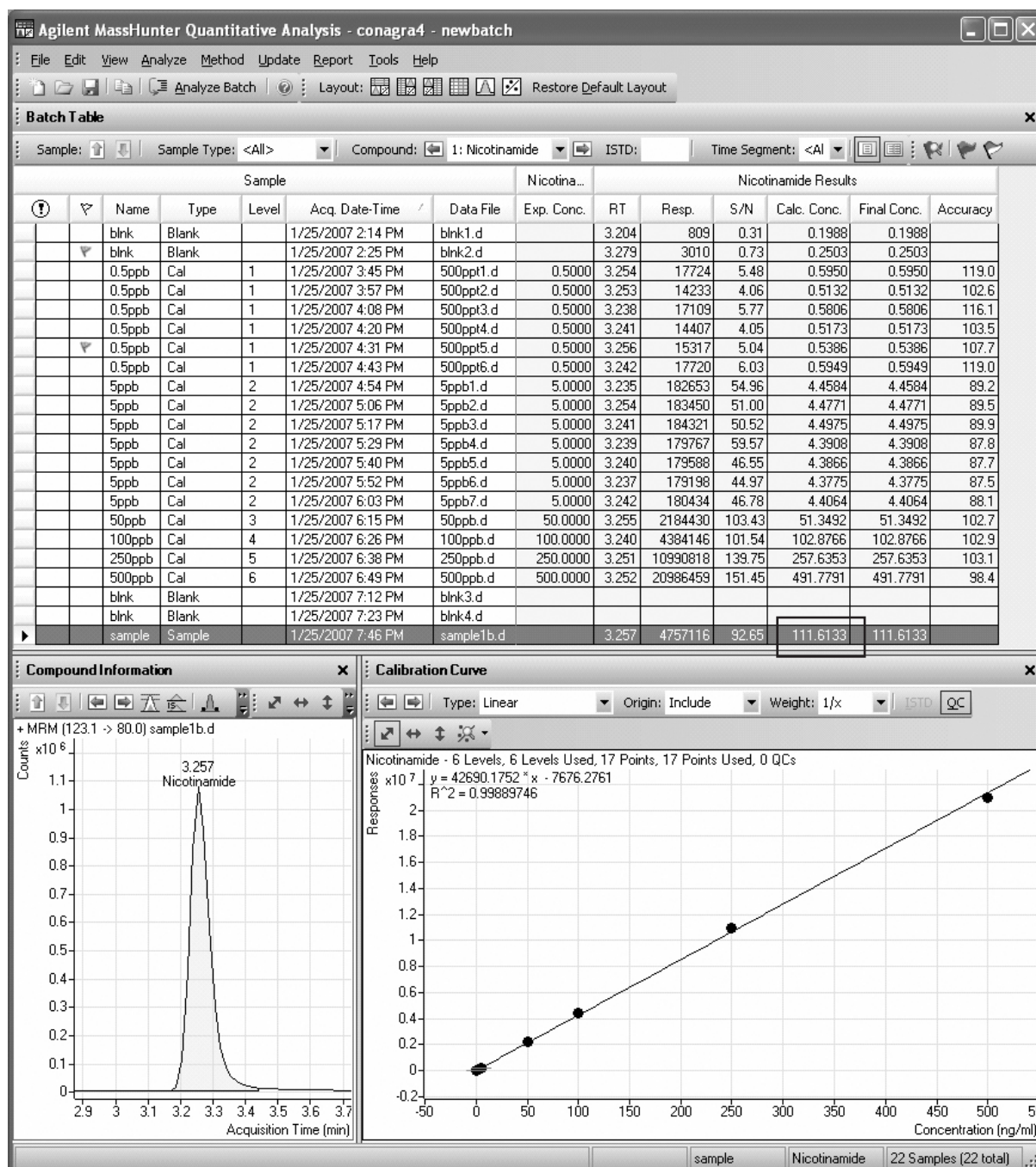


図 4. サンプル中のニコチンアミドの定量バッチ結果。濃度は 116.6 pg/μL と計算されました (図中の囲み部分)。

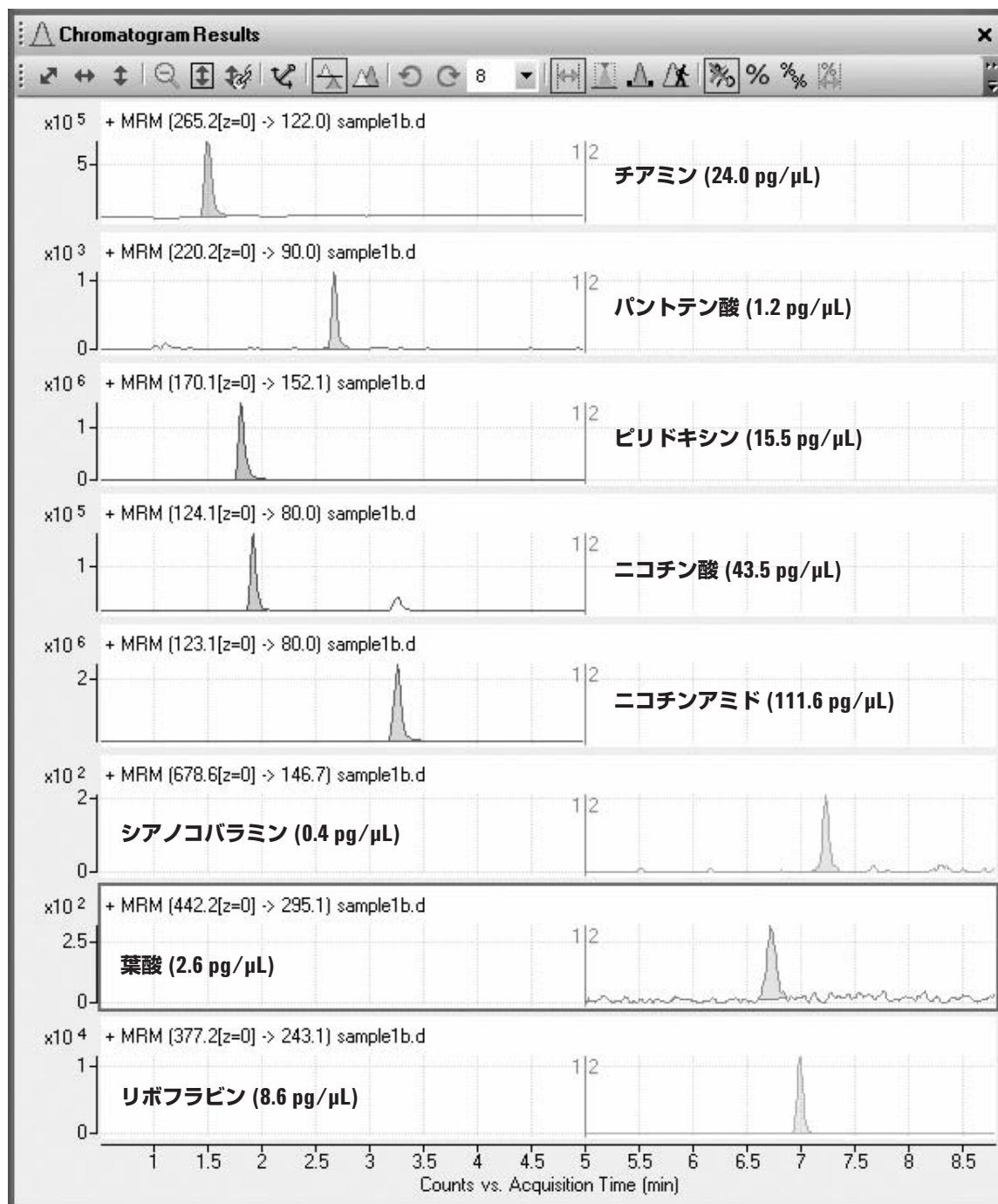


図 5. 強化抽出物中の化合物のクロマトグラムと濃度

結論

水溶性ビタミン B を LC/MS/MS で分析し、良好な結果を得ました。ピリドキシンを除き、他のすべての化合物について $R^2 > 0.99$ の良好な直線性が 3 桁にわたり実証されました。強化サンプルでは、シアノコバラミン濃度だけが定量下限を下回りましたが、他の化合物は良好な分析結果を示しました。

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。また、本文書掲載の機器類は薬事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。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。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
July 25, 2007
5989-7084JAJP



Agilent Technologies