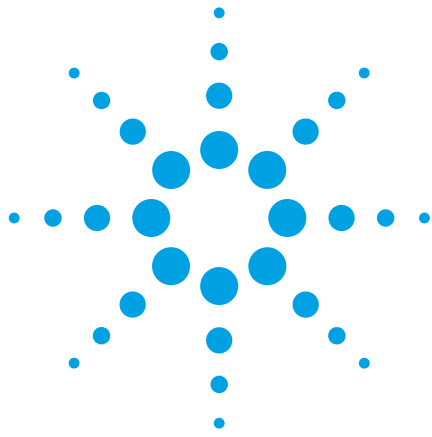




Poroshell 120 EC-C18 を用いた マルチビタミン錠剤中の 水溶性ビタミンの分析

アプリケーションノート

医薬品

著者

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809-1610
USA

概要

さまざまなサイズの Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムで開発された 9 種のマルチビタミン化合物の分離メソッドを、Agilent 1260 ラピッドレゾリューション LC を使用した Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm x 75 mm、2.7 μ m カラムに変換しました。評価する各カラムの最適な流量を判断する目的でリテンションインデックスを維持したまま、グラジエントと流量を拡張しました。新しい分離では、分析時間が一定の 5 分に保たれ、より高い流量でより長いカラムを使用できますが、圧力は 400 bar 未満に維持されます。使用したサンプル前処理では、錠剤を水に溶かした後、0.45 ミクロンのシリンジフィルタによるろ過または遠心分離を行いました。圧力を上げることなく 800 回を超える分析を行いました。

はじめに

体内では十分な量を合成できず、食品から摂取する必要のある化合物をビタミンと呼びます。ビタミンには、さまざまな生化学機能があります。多くのビタミンは酵素補因子の前駆体として機能し、酵素が代謝の触媒として機能するのを助けます。ビタミンは、分子間で化学基または電子を搬送する遊離分子である補酵素として酵素触媒との強い結合を行わない場合もあります。



Agilent Technologies

ビタミンは、それが溶解する物質によって 2 種類に分類されます。ビタミン D や E などの脂溶性ビタミンは、血流に吸収されてその機能を果たす前に、脂質に溶解します。これらのビタミンの余剰は肝臓に蓄えられます。これらは貯蔵されるため、食品で毎日摂取する必要はありません。

反対に、水溶性ビタミンは水に溶解し、貯蔵されません。尿と共に排出されます。これらは食品で継続的に供給する必要があります。水溶性ビタミンは、ビタミン B 複合体群とビタミン C です。

チアミン、リボフラビン、ナイアシン、ピリドキサルリン酸、葉酸、コバラミン、パントテン酸の B 複合体群、およびアスコルビン酸 (ビタミン C) は、食物に広く含まれています。たとえば、リボフラビンは、レバー、牛乳、緑黄色野菜、全粒穀物および強化穀物製品、卵から摂取できます。その影響は、身体の多くの部分で感じられます。これらは、身体が食物からエネルギーを得るのを助ける補酵素として機能します。視力、皮膚の健康、神経系の健康、および赤血球細胞の形成にも重要です。

最初の酵母抽出物および半合成ビタミン C サプリメント錠剤が市販された 1930 年代半ばまで、ビタミンは摂食によってのみ摂取され、(作物の不作による) 食品の変化によって摂取されるビタミンの種類と量が変化することがありました。20 世紀半ば以降、ビタミンは商業化学製品として生産され、安価な合成マルチビタミン栄養補助食品として広く入手可能になりました [1]。

目的のビタミンの含有に加えて、セルロース、マルトデキストリン、デキストリン、ゼラチン、グルコース、大豆レシチンなどの賦形剤が錠剤に調合されています。錠剤のサイズが大きく、含まれる多種のビタミンが比較的少量のため、この分析を粒径の小さいカラムで行ったときには、詰まり (クロッキング) の問題に悩まされました。

逆相 HPLC は、ビタミンの分析に適しています。ビタミンの定性および定量分析は、臨床、食品、および医薬品アプリケーションにとって重要です。前述の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、1.8 μm カラムで開発したメソッドを使用して、高速分離メソッドを Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムで使用するように変換しました [2]。新しいメソッドは依然として高速ですが、マルチビタミンに添加された賦形剤による詰まりが、あまり発生しません。

この作業では、Agilent Eclipse Plus C18 4.6 mm x 50 mm、1.8 μm カラムを用いたメソッドを、Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm x 75 mm カラムを使用するように変換しました。カラムボリュームが増えますので注入量を増すことができ、また、Poroshell 120 カラムにすることで、詰まりのリスクも軽減しました。

実験

今回の作業では、Agilent 1260 ラピッドレゾリューション LC (RRLC) システムを使用しました。

- ポンプは G1312B バイナリポンプ SL を使用し、グラジエントは 1 % B から開始し、その濃度で保持してから 12 % B に上昇させ、最後に 30 % B まで上昇させてその濃度で保持してから、初期条件に再平衡化しました。システムは、パルスダンパと標準ミキサを取り付けて構成しました。移動相 A には 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 2.5、B にメタノールを用いました。
- オートサンブラは G1367E オートサンブラ (ALS) SL を用い、5 μL の注入量としました。
- カラム恒温槽は G1316B カラムコンパートメント (TCC) SL を用い、温度を 35 $^{\circ}\text{C}$ に設定しました。
- 検出器は G4212C ダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いました。シグナルを 230 nm に設定し、リファレンスは使用しませんでした。セルは、G4212-60008 ミクロフローセル (10-mm パス、1 μL 容量) を使用しました。
- ChemStation バージョン B.04.02 を使用して、HPLC をコントロールし、データを処理しました。
- カラムは、Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 mm x 75 mm、2.7 μm 、P/N 697975-902 を用いました。

対象の化合物は、それぞれの構成と共に参考文献 2 に示されています。標準品を水に溶解し、1 mg/mL とし、用いました。チアミン (ビタミン B₁)、リボフラビン (ビタミン B₂)、ナイアシン、ビタミン B₆、葉酸、ビタミン B₁₂、ビオチン、パントテン酸、アスコルビン酸の各化合物は Sigma Aldrich (ペンシルバニア州ベルフォント) から購入しました。Sigma Aldrich からはリン酸二水素ナトリウムとリン酸も購入しました。メタノールは、Honeywell, Burdick and Jackson High Purity (ミシガン州マスキーゴン) から購入しました。水は、18 MW W Milli-Q 水 (マサチューセッツ州ベッドフォード) を用いました。マルチビタミン錠剤は、薬局 (One a Day Women's Active Metabolism, Bayer HealthCare (ニュージャージー州モリスタウン)) で購入しました。

錠剤は、それぞれ乳鉢と乳棒を使用してすりつぶし、全重量 (約 1.6766 g/錠) を 100 mL の水と共に 150 mL のプラスチックコーティングボトルに移しました。ボトルをシーリングし、5 分間強く振りまわしました。これをろ過 (0.45 μm 、30 mm 再生セルロースフィルタ (P/N 5061-3364) と 10 mL シリンジを使用) またはポリプロピレンチューブで遠心分離 (6000 rpm で 5 分間) しました。溶液を Agilent MS 証明バイアル (ラベル付) (P/N 5190-2278) に移しました。

結果と考察

このメソッドをオリジナルのメソッドから変換するときに、より長いカラムを選択し、それに比例して高い流量で使用しました。前回の報告では、より高い直線速度 (1 m/min ではなく 1.5 mL/min) で、Agilent Poroshell 120 EC-C18 (前回に使用した 50 mm カラムではなく 75 mm) に対してより高いピークキャパシティが得られることが示されました [3]。また、より大きな Poroshell カラムでは、カラム容量に比例して注入量の増加が可能です。Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (前回使用した 50 mm カラムではなく 75 mm) と Poroshell 120 EC-C18 の選択性は非常に似ていることが前回の作業で示されました [4, 5]。また、Huber による水溶性ビタミンの分析に関する前回の技術情報で推奨されているように [7]、カラムが大きいほど、冷却オートサンブラを使用する場合に必要な追加のチューブ [6] など、追加のカラム効果の影響を受けにくくなります。今回の作業では、グラジエントの先頭に溶出順序のわずかな変化が見られました。これは、カラム多孔度 (全多孔質から表面多孔質)、機器の配管容量、または分析間の平衡化時間が変化した結果である可能性があります。図 1 に、

最大ピークにスケーリングした代表的なサンプルクロマトグラムを示します。左上隅に、拡大したクロマトグラムを示します。これにより、ピーク強度が低くなっていることがわかります。クロマトグラフィ条件と、溶出順の成分の一覧を右上に示しています。

ビタミン錠剤抽出物の 800 回を超える分析を、カラムが詰まることなく実施することができました。これが可能な理由のひとつは、Poroshell 120 カラムが、2-ミクロン以下または全多孔質 3 μm カラムで使用される多孔度の低いフリットよりも詰まりにくい、孔径 2 μm のフリットを用いていることが挙げられます [8]。システム圧を変えずに、遠心分離で処理したサンプルを少なくとも 100 回注入しましたが、この場合、ろ過の方が高速なメソッドで、最終サンプル調製の手順が少なく済むことがわかりました。0.45 μm の再生セルロースフィルタは、2 ミクロン以下のカラムで使用する必要のある 0.2 μm フィルタよりもろ過する際の負荷が少なく済みます。注入ごとの圧力変化を示すプロットを図 2 に示します。6 L リン酸緩衝液を使用した 3 日を超える分析では、圧力が 177 bar から 179 bar に増加しただけでした。

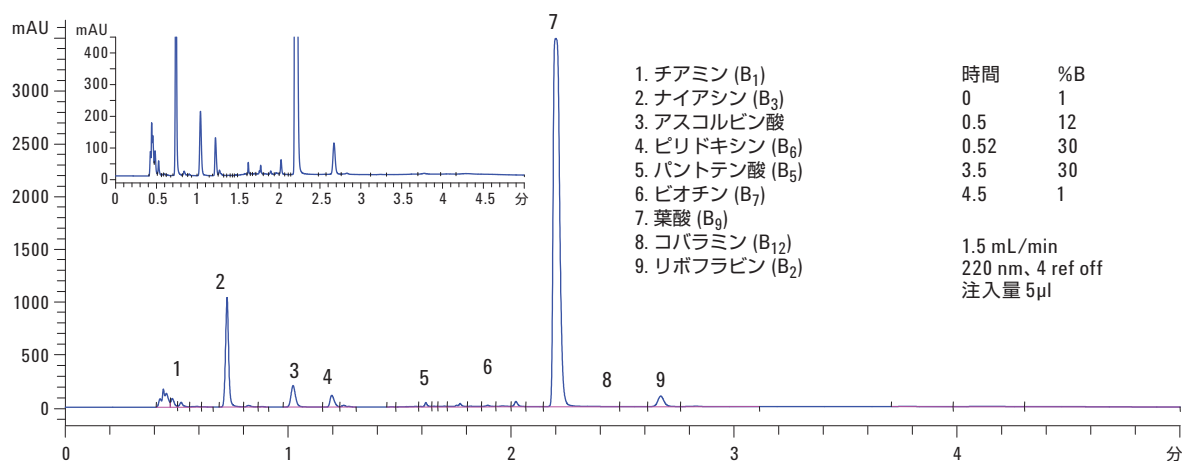


図 1. 水溶性ビタミンの溶出順序

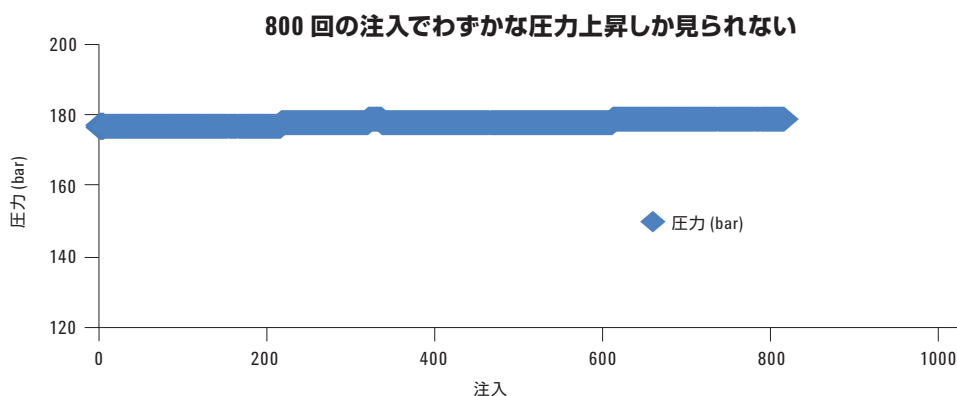


図 2. Agilent Poroshell 120 EC-C18 のカラム圧は、水溶性ビタミン錠剤を 800 回注入した後もほぼ一定です

これらの化合物のいくつかは黄色または赤色の水溶液で、スペクトルの可視領域の吸光度を示すため、この分析には他の波長も使用できます [9]。不適切なリファレンス波長の選択はネガティブピークなどにつながるため、リファレンス波長を使用する場合は注意する必要があります。

結論

表面多孔質粒子が充填された HPLC カラムには、従来の全多孔質粒子が充填されたカラムよりも多くの利点があります。表面多孔質 2.7- μm Agilent Poroshell 120 EC-C18 は、高いカラム圧を必要とせず、1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと同様の効率と選択性を提供します。2 μm フリットは、800 回を超えるサンプルの分析で詰まりに対する耐性を示しました。

参考文献

1. H. Stephen Stoker, "General, Organic and Biological Chemistry." 5th Edition Publisher: Boston, MA: Houghton Mifflin Co., 2006.
2. Anna Glinko, Michael J. Bozym, Michelle L. Owens, Karyn Usher, and Ronald E. Majors, 「Agilent ZORBAX Eclipse Plus カラムを用いた水溶性ビタミンの逆相 HPLC 分離」アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-9313JAJP, August 6, 2008.
3. William Long and Anne E. Mack, "Fast Analysis of Environmental Phenols with Poroshell 120 EC-C18 Columns," Agilent Technologies publication 5990-6156EN, August 31, 2010.

4. Agilent Technical Note, "Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns," Agilent Technologies publication 5990-6588EN, February 9, 2011.
5. Anne E. Mack and William J. Long "Fast, Low Pressure analysis of food and beverage additives using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column." Agilent Technologies publication 5990-6082EN, July 8, 2010.
6. William J. Long and Anne E. Mack, "Reduce Tubing Volume to Optimize Column Performance," Agilent Technologies publication 5990-4964EN, November 16, 2009.
7. Udo Huber, Analysis of Water-Soluble Vitamins by HPLC, 12/98, Agilent Technologies publication 5968-2971EN.
8. Long, W. and Mack, A. "Fast Analysis of Sulfa Drugs using the Agilent 1100 Series LC with Agilent Poroshell 120 EC-C18 columns," Agilent Technologies publication 5990-5572EN, 2010.
9. Detlef Wilhelm, "Determination of water soluble vitamins with the Agilent 1120 Compact LC after method development with the Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system and back transfer," Agilent Technologies publication 5990-4379EN, June 15, 2010.
10. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe D. Neue, Zoubair El Fallah, A new small particle packing for faster analysis with high resolution Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 15 (1997) 1389-1395.

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。

www.agilent.com/chem/jp

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は、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., 2011
Printed in Japan
May 27, 2011
5990-8107JAJP



Agilent Technologies