

# LC-MS/MS を用いた食品中に含まれる水溶性ビタミン類の 迅速一斉分析法の検討

橋本 知子、瀬戸山 央、廣川 隆彦（化学技術部 バイオ技術グループ）

## 1. はじめに

現在確立されている水溶性ビタミン類の分析は、微生物定量法や HPLC 法などの方法がある<sup>1)</sup>。微生物定量法は感度が高いが、培養時間が必要なため分析に長い時間を要し、また試薬が高価である等の欠点がある。

HPLC 法は微生物定量法と比較して検出感度が劣っていたが、ポストカラム誘導体化法やイオンペア試薬を用いるなどの工夫で検出感度が高められ、ほとんどの水溶性ビタミン類を HPLC 法で測定することが可能となった。しかし、これらの分析法は成分ごとに分析条件が異なるため、複数成分を一斉に分析するには長い分析時間を要する<sup>2)</sup>など困難であった。

そこで、本研究では簡便さ、迅速性および正確さを兼ね備えた分析方法を確立することを目的とし、LC-MS/MS を用いた水溶性ビタミン類の一斉分析法の検討を行った。

## 2. 実験及び結果

### 2-1. 試料調製の検討

試料として、11 種類の水溶性ビタミンを用いた。リボフラビン(B2)、ピオチン(B7)、葉酸(B9)については、それぞれ少量の 1 N NaOH に溶解させ、超純水で 1 mg/mL に調製したものをストック溶液とした。アスコルビン酸(C)は、クエン酸緩衝液(pH3.2)を用いて 1 mg/mL に調製したものをストック溶液とした。上記以外の 7 種類の水溶性ビタミンについては、それぞれ超純水を用いて 1 mg/mL に調製し、ストック溶液とした。

アスコルビン酸(C)、ニコチンアミド(B3)、ピオチン(B7)ストック溶液 2.5 mL、葉酸(B9)ストック溶液 1.25 mL、チアミン(B1)、リボフラビン(B2)のストック溶液 各 0.25 mL、シアノコバラミン(B12)、ニコチン酸(B3)、パントテン酸カルシウム(B5)、ピリドキサール(B6)、ピリドキシニン(B6)のストック溶液 各 0.025 mL を混合し、10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液で 25 mL に定容したところ、溶液は懸濁した。試料溶液が酸性だと懸濁が起こることが判明した。そのため、酸性条件で調製しているアスコルビン酸(C)を除いた 10 種類の水溶性ビタミンについて、ニコチンアミド(B3)、パントテン酸カルシウム(B5)ストック溶液 2.5 mL、葉酸(B9)ストック溶液 1.25 mL、チアミン(B1)、リボフラビン(B2)のストック溶液 各 0.25 mL、シアノコバラミン(B12)、ニコチン酸(B3)、ピオチン(B7)、ピリドキサール(B6)、ピリドキシニン(B6)、のストック溶液 各 0.025 mL を混合し、10 mM ギ酸アンモニウム水溶液で 25 mL に定容

したところ、懸濁しなかった。しかし、シアノコバラミン(B12)はアルカリ下で不安定であることから、試料溶液を中性に調製する必要がある。

この結果から、最終的な標準溶液調製方法として、パントテン酸カルシウム(B5) ストック溶液 2.5 mL、葉酸(B9) ストック溶液 1.25 mL、ニコチンアミド(B3)、チアミン(B1)、リボフラビン(B2)のストック溶液 各 0.25 mL、シアノコバラミン(B12)、ニコチン酸(B3)、ピオチン(B7)、ピリドキサール(B6)、ピリドキシニン(B6)のストック溶液 各 0.025 mL を混合し、少量の 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液を加えた後 0.1% ギ酸水溶液を 1 mL 加え、最後に 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液を用いて 25 mL に定容、0.22 $\mu$ m フィルターでろ過したものを混合標準溶液とした。これを 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液で希釈して 4 種類の濃度の混合標準溶液を調製し、これを検量線作成試料とした。

### 2-2. 装置及び測定条件の検討

LC-MS/MS は Waters 社製の ACQUITY UPLC H-Class Xevo TQD を使用した。

LC 部については、分析カラムは Waters 社製の AQUITY UPLC HSS T3、2.1 $\times$ 100 mm、粒子径 1.8  $\mu$ m を用いた。移動相については、A 液として 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液を、B 液として 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸メタノール溶液を用い、グラジエント条件は 0min(A 液: 99%)、3.01 min(A 液: 95%)、5.10 min(A 液: 80%)、7.10 min(A 液: 2%)、9.10 min(A 液: 99%)とし、分析時間は

表 1 MRM 条件

化合物名	略称	プレカークイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
1チアミン	B1	265.1	122.1	24	17
2ニコチン酸	B3	123.9	80.0	40	20
3ピリドキサール	B6	168.1	150.1	27	15
4ピリドキシニン	B6	170.1	152.1	28	14
5ニコチンアミド	B3	123.0	80.0	40	20
6パントテン酸カルシウム	B5	220.1	90.1	30	15
7シアノコバラミン	B12	678.3	147.1	45	40
8葉酸	B9	442.2	295.1	23	17
9ピオチン	B7	245.1	227.1	35	13
10リボフラビン	B2	377.1	243.1	50	25

17.5 min とした。また、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 0.45 mL/min、サンプル注入量は 5  $\mu$ L とした。

MS 部については、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法によるポジティブイオンモードの多重反応モニタリング(MRM)にて測定を行った。キャピラリー電圧は、1.0 kV、

ソース温度は 120℃、脱溶媒ガス温度および流量は 500℃、1000 L/hr、コーンガス流量は 50 L/hr に設定した。

化合物ごとの MRM の条件を検討し、その結果は表 1 に示した。

### 2 - 3 . LC-MS/MS を用いた一斉分析

図 1 に水溶性ビタミンの標準溶液の MRM 重ね書きクロマトグラムを示した。

すべてのビタミンのピーク形状が良好であり、8 分以内に溶出することが判明した。この条件で分析する場合、1.0~1.5 分付近のチアミン(B1)とニコチン酸(B3)、2.5~3.0 分付近のピリドキサル(B6)とニコチンアミド(B3)、7.25 分付近のシアノコバラミン(B12)と葉酸(B9)、7.5 分付近のピオチン(B7)とリボフラビン(B2)のピークが近接して溶出されたが、MS 検出器を選択することで、近接して溶出している化合物についても検出可能であることが判明した。

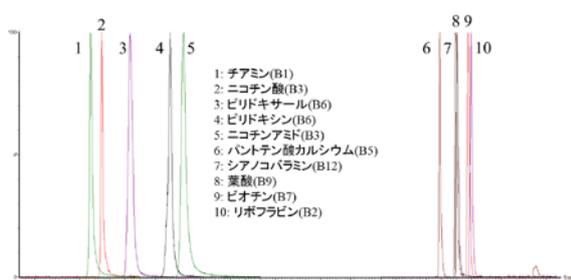


図 1. 水溶性ビタミンの重ね書きクロマトグラム

図 2 に同時溶出した 10 種類の水溶性ビタミン類の検量線を示した。直線性の範囲はチアミン(B1)、ニコチンアミド(B3)が 0.05~0.5 mg/mL、ニコチン酸(B3)、ピオチン(B7)、ピリドキサル(B6)、ピリドキシン(B6)が 0.005~0.1 mg/mL、パントテン酸カルシウム(B5)は 0.5~5 mg/mL、シアノコバラミン(B12)は 0.01~0.1 mg/mL、葉酸(B9)が、0.25~2.5 mg/mL、リボフラビン(B2)が、0.05~1 mg/mL だった。決定係数はいずれの化合物についても 0.9997 以上となった。

### 3 . 考察及び今後の展開

11 種類の水溶性ビタミンの一斉分析について試みた。

試料溶液は、酸性側に傾くと懸濁することが判明した。アスコルビン酸(C)は酸性下の溶液で安定することから、アスコルビン酸(C)と、それ以外の水溶性ビタミン類は別々に測定することが望ましいと考えられた。

今回確立した LC-MS/MS の条件により、10 種類の水溶性ビタミンの一斉分析が可能であることが判明した。

今後、本手法を用いて、市販のサプリメントや飲料などを使って定量可能かどうか検討するとともに、効率よくすべてのビタミンが抽出できる抽出条件についても検討す

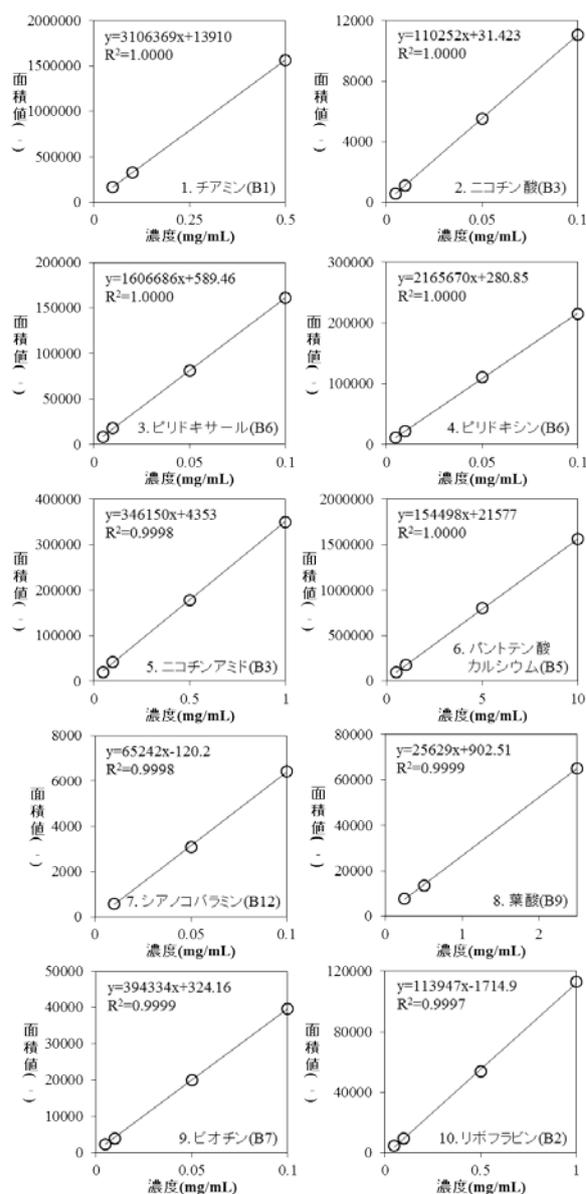


図 2. 水溶性ビタミンの検量線

る予定である。

#### 【参考文献】

1. 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室, 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)分析マニュアル・解説, 108-142 (2016).
2. 森居京美, 大橋正多孝, 田中健, 北田善三, 日本食品化学学会誌, **11**, 19-25 (2004).