

UPLC-QDa による血清中ビタミン C の迅速で簡単な臨床研究分析法

Karl C.K. Lo, Fionn Quinlan, Mark Ritchie

Waters Corporation

要約

ACQUITY UPLC H-Class PLUS およびシングル四重極質量検出器 ACQUITY QDa を用いた、血清中ビタミン C 分析のための臨床研究分析法について説明します。トリクロロ酢酸 (TCA) による簡単な除タンパクにより、UPLC-QDa によるビタミン C の分析に十分な選択性と分析感度が得られます。UPLC QDa は、脂溶性ビタミン¹ から水溶性ビタミンまで、臨床研究目的のビタミン分析システムとして、適切です。

アプリケーションのメリット

- 必要な血清量を 200 µL に削減
- 簡単なサンプル前処理
- 合計分析時間 6 分の血清中ビタミン C の正確で高感度な分析法

はじめに

ビタミン C (L-アスコルビン酸) は、水溶性ビタミンで、ヒトにとって必要不可欠な栄養素です。ビタミン C の血中濃度の研究分析法が開発されました。血漿中ビタミン C の分析には、電気化学検出器 (ECD) または紫外線 (UV) 検出器を搭載した HPLC が、一般的に推奨されています^{2,3}。電気化学検出は、その固有の利点である簡便性、小型化の容易さ、高い分析感度、比較的低コストにより、電気活性分子種の検出には魅力的な方法です¹。ただし、ECD 検出法お

よび UV 検出法のどちらにも、複雑なサンプル前処理、移動相、専用のカラム、長い分析時間が必要です。QDa 検出では、高い分析感度と選択性を持つだけでなく、UPLC に適合する速度および確認のための質量情報も提供されます。

実験方法

200 μ L のサンプル（キャリブレーター、コントロール、または未知）を、清浄なマイクロチューブにピペッティングしました。600 μ L の作業用内部標準試料（1.67 μ g/ml のビタミン $^{13}\text{C}_6$ 含有 12% TCA（v/v））を添加しました。チューブにキャップを付け、1,000 rpm で 5 分間マルチチューブボルテックス混合をしてから、11,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上清 400 μ L を、LC-MS 分析用のマキシマムリカバリーバイアルに移しました。Atlantis Premier BEH C₁₈ AX カラム（1.7 μ m、2.1 $\times$ 100 mm、製品番号：186009368 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009368-atlantis-premier-beh-c18-ax-column-17--m-21-x-100-mm-1-pk.html>>）を装着した ACQUITY UPLC H-Class PLUS システムを使用し、95% 移動相 A（MP A）から 5% MP A までのグラジエント溶出を実行して、分離しました。注入間の時間は 6 分でした。

LC 条件

LC システム：	ACQUITY UPLC H-Class PLUS
バイアル：	12 $\times$ 32 mm アンバー色スクリーネックバイアル、キャップ付き、スリット入り PTFE/シリコーンセプタム、マキシマムリカバリー（製品番号：600000755 CV）
カラム：	Atlantis Premier BEH C ₁₈ AX カラム、2.1 $\times$ 100 mm、1.7 μ m（製品番号：186009368）
カラム温度：	40 °C
サンプル温度：	10 °C
注入量：	3 μ L
流速：	0.40 mL/分

移動相 A: 20 mM ギ酸アンモニウム水溶液

移動相 B: 20 mM ギ酸アンモニウム含有 MeOH

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.40	95	5	初期条件
2.00	0.40	25	75	4
2.50	0.40	5	95	6
3.50	0.40	5	95	6
4.00	0.40	95	5	6
6.00	0.40	95	5	6

MS 条件 (QDa パラメーター)

MS システム: ACQUITY QDa

イオン化モード: ESI-

取り込みモード: SIR

キャピラリー電圧: 0.8 kV

コーン電圧: チャンネルの詳細を参照してください

	SIR、 m/z	コーン電圧 (V)	時間
ビタミン C	175	20	0~2.5
	115	15	
ビタミン $^{13}\text{C}_6$ (IS)	181	20	
	119	15	

データ管理

LC-MS ソフトウェア:

MassLynx 4.2

結果および考察

図 1 に、処理済み血清中の 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ビタミン C のクロマトグラムが示されています。分析感度を調査し、血清中の 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ビタミン C の定量を達成できることが実証されました ($\%RSD < 20\%$ 、 $Bia < 15\%$ 、 $S/N > 10$)。図 2 にこの分析法の検量線が示されています。この分析法は、0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性を示しました。相関係数 (r^2) は 0.995 を超え、すべてのキャリブレーション残差は 15% 未満でした。



	QC 総合精度 (%RSD)			QC 併行精度 (%RSD)		
ビタミン C	QC1 (低)	QC2 (中)	QC3 (高)	QC1 (低)	QC2 (中)	QC3 (高)
	4.05	4.70	4.83	4.96	5.51	5.80

5

マトリックス係数の結果は、内部標準試料を使用して補正した分析者 6 名からの試験サンプルとコントロールサンプルの間で ±15% 以内でした（表 2）。ビタミン C について有意なマトリックス増強が観察されましたが、これも内部標準試料によって補正しました（調整したマトリックス係数は 1 に近い）。

化合物	スパイク濃度	マトリックス係数 - 絶対ピーク面積 (範囲)	マトリックス係数 - 調整済み濃度 (範囲)
ビタミン C	1 µg/ml	3.507 (3.393~4.609)	1.059 (0.959~1.065)
	15 µg/ml	1.992 (1.684~2.176)	0.975 (0.959~0.978)

表 2. マトリックス試験の結果

結論

脂溶性ビタミンから水溶性ビタミンまでの臨床研究における、UPLC シングル四重極 MS システムである ACQUITY QDa 質量検出器の適用を詳しく調べました。調製が簡単で分析時間が短いことにより、従来の HPLC 分析法に比べて大きな利点が得られます。UPLC-QDa は、臨床研究分析でのビタミン分析システムとして適していることが、十分に実証されています。

参考文献

1. Analysis of Vitamin A and E in Serum by UPLC-QDa for Clinical Research. Waters Corporation, 2021
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007164en.pdf> <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007164en.pdf>> .
2. Gazdik, Z.; Zitka, O.; Petrlova J.; Adam, V.; Zehnalek, J.; Horna, A.; Reznicek V.; Beklova, M.; Kizek, R.
Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection. *Sensors*, 2008, 8, 7097–7112.
3. Robitaille, L; Hoffer, L, J. A Simple Method for Plasma Total Vitamin C Analysis Suitable for Routine Clinical

Laboratory Use. *Nutrition Journal*, 2016, 15:40.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY QDa 質量検出器 <<https://www.waters.com/134761404>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

720007322JA、2021 年 10 月 改訂

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)