

ノート

高速液体クロマトグラフィーによる水溶性ビタミンの分離

鈴木 稔, 矢ヶ崎 国 秀, 川 端 省 三*

Separation of Water - Soluble Vitamins by High Performance Liquid Chromatography

Minoru SUZUKI, Kunihide YAGASAKI and Shozo KAWABATA*

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, wase, Matsudo-Shi, Chiba-ken, 271 Japan

High performance liquid chromatographic method (HPLC) for separation of water - soluble vitamins ; L - ascorbic acid (vitamin C), pyridoxin HCl (vitamin B₆), niacinamide, riboflavin (vitamin B₂), cyanocobalamin (vitamin B₁₂) and thiamin HCl (vitamin B₁) was investigated.

The above six vitamins could be separated by mobile phase ; 1) 1 / 15 M - phosphate buffer (pH 7.0) - methanol (75 : 25 V / V), 2) water - methanol (80 : 20 V / V) containing 5×10^{-3} M PIC - A reagent on bonded column, μ - Bondapak C₁₈.

It was found that the method was able to apply to analysis of water soluble vitamin products.

- Recieved April, 1988 -

1 緒 言

近年、十数種のビタミンを混合した栄養補助食品としてのビタミン調製剤や数種のビタミンを添加した飼料等の輸入が増えている。

関税率表分類上、これらの調製品は、各ビタミンの分析が必要となってくる場合がある。

これらのビタミンの分析法は、種々検討され、滴定法、比色法、蛍光法、微生物法、GC法、TLC法、HPLC法等多くの報告^{1)~4)}がなされ、当所や税関においても様々な試みがなされ、報告^{5)~7)}がされてきた。

今回、高速液体クロマトグラフィーを用い、数種の水溶性ビタミンを迅速かつ簡易に分離する方法について基本的検討をしたので報告する。

2 実 験

2.1 試料及び試薬

L - アスコルビン酸 (ビタミン C) 和光純薬工業製、チアミン塩酸塩 (ビタミン B₁)、ピリドキシン塩酸塩 (ビタミン B₆)、シアノコバラミン (ビタミン B₁₂) SIGM 社製、リボフラビン (ビタミン B₂)、ニコチン

*大蔵省税関中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

ンアミド, 東京化成工業社製

2. 2 装置及び測定条件

液体クロマトグラフは, ウォーターズ社製高速液体クロマトグラフ Model No. ALC / GPC 244 型を用い, 検出は, 島津社製紫外検出器 SPD - 2A で 260nm 及び 280nm の 2 つの検出波長で感度を比較検討した。

カラムは, 内径 7.8mm, 長さ 30cm のステンレス管に固定相として μ - Bondapak C₁₈ (球状シリカゲルにオクタデシル基を化学結合したものを) を充てんしたものを用いた。

移動相は, メタノール (高速液体クロマトグラフ用) 及びりん酸緩衝液 (pH 5.9 及び pH 7.0) の混合溶液, メタノール / 水の混合溶液に PIC - A 試薬 (テトラブチルアンモニウムフォスフェート, ウォーターズ社製) を $5 \times 10^{-3}M$ 濃度になるように調製したものを用いた。

移動相の流量は, 1.0ml / min に規定した。

試料及び移動相溶液は, 0.45 μm , メンブランフィルターでろ過し, ろ液を用いた。

3 結果及び考察

3. 1 検出波長

各ビタミンの吸収極大波長は, Table 1⁸⁾に示すように 250nm ~ 290nm 付近にあるので各試料について 3 つの異なる濃度のピークの高さを 260nm 及び 280nm で測定した。(Fig. 1)。

Table 1 Absorption maximum of water soluble

Vitamin	λ max (nm) [$\epsilon \times 10^{-3}$]
L-ascorbic acid	pH 6.4 265[20.4]
thiamin HCl	pH 6.0 267[9.0]
riboflavin	H ₂ O 224[30.1], 268[31.4], 337[10.8], 448[12.3]
pyridoxin HCl	pH 7.0 253[3.7], 325[7.1]
niacinamide	0.1 N HCl 261[4700]
cyanocobalamin	H ₂ O 278[15.5], 361[28.1], 551[8.7]

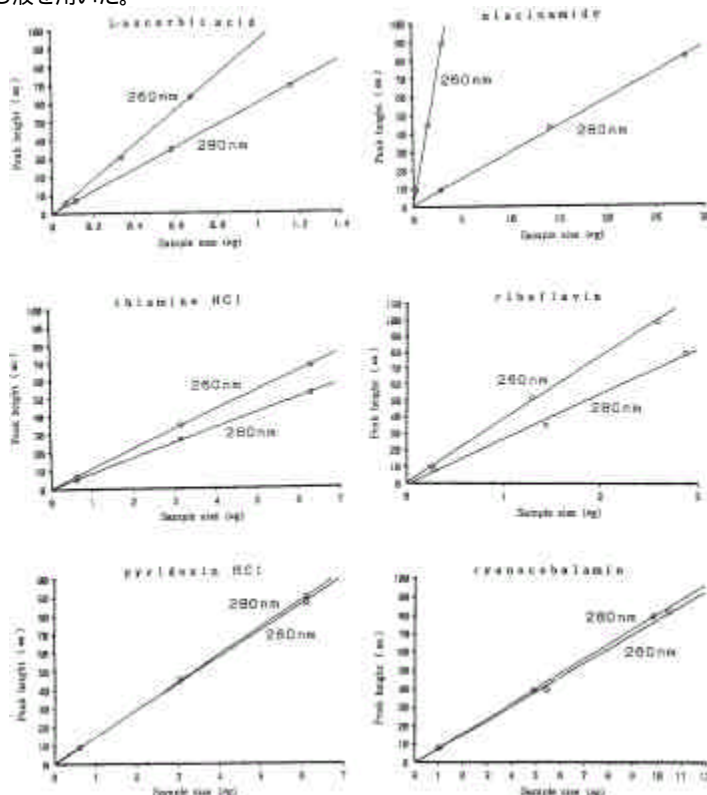


Fig. 1 Liner dynamic ranges in UV photometer

L-アスコルビン酸、ニコチンアミド、チアミン塩酸塩、リボフラビンは、260nm における感度が高く、ピリドキシン塩酸塩及びシアノコバラミンは、280nm の方がわずかに感度が高いため 検出波長は 260nm とした。

3.2 分離条件の検討

固定相に μ -Bondapak C₁₈ を用い、移動相に 1/15M リン酸緩衝液(pH 5.9):メタノール=70:30 (V/V)で混合試料を分離すると、Fig. 2 に示すようにニコチンアミドとピリドキシン塩酸塩及びリボフラビンとシアノコバラミンは、完全に分離できなかった。

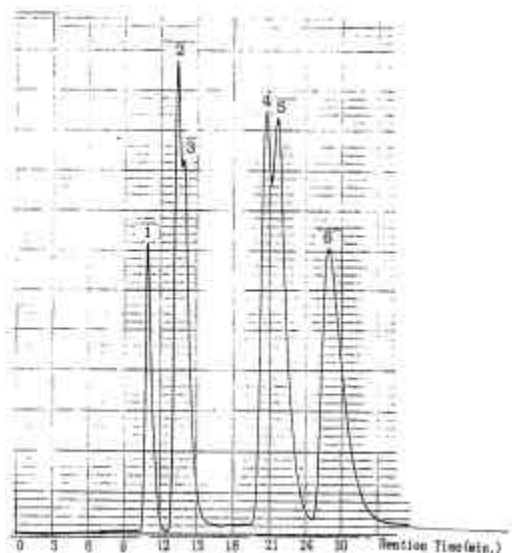


Fig. 2 HPLC of water - soluble vitamins

mobile phase, 70 : 30 1 / 15M phosphate buffer (pH 5.9) / methanol ; column , μ - Bondapak C₁₈ ; column pressure, 2000psi ; detector, UV photometer ($\times 0.0005$ a. u. full scale)

1-L-ascorbic acid, 2-pyridoxin HCl, 3-niacinamide, 4-cyanocobalamin, 5-riboflavin, 6-thiamine HCl

そこで移動相を 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.0) メタノール=75 : 25 (v/v) にすることによってニコチンアミドとピリドキシン塩酸塩を完全分離することができた (Fig. 3)。この条件下では、6 種の混合試料中のリボフラビンとシアノコバラミンは、単一

ピークとして溶出し、分離されない。



Fig. 3 HPLC of pyridoxin HCl and niacinamide

mobile phase, 75 : 25 1 / 15M phosphate buffer (pH7.0) / methanol ; column, μ - Bondapak C₁₈ ; column pressure, 2000 psi ; detector, UV photometer ($\times 0.0005$ a. u. full scale)

1 - pyridoxin HCl, 2 - niacinamide,

水 : メタノール = 80 : 20 (V/V) に PIC - A 試薬を 5×10^{-3} M 濃度になるように調製した移動相で、リボフラビンとシアノコバラミンをほぼ完全分離することができた (Fig. 4)。なお、この条件下では、6 種の混合試料中のニコチンアミドとピリドキシン塩酸塩は、単一ピークとして溶出し、分離されない。

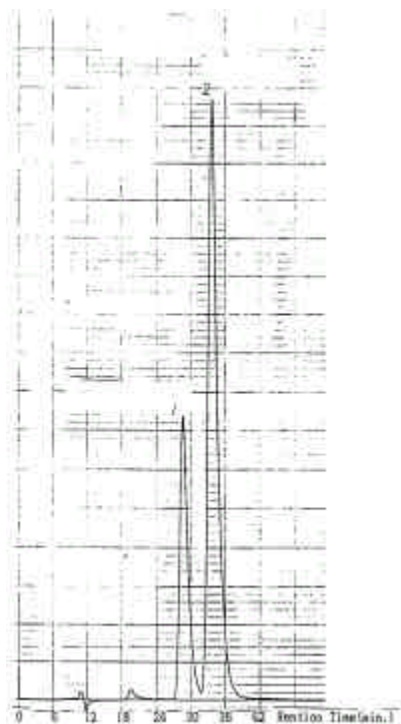


Fig. 4 HPLC of cyanocobalamin and riboflavin
mobile, phase, 80:20 water / methanol
containing 5×10^{-3} M PIC - A reagent, column,
 μ - Bond - apak G_8 ; column pressure, 2000
psi; detector, UV photometer ($\times 0.0005$ a. u. full
scale)

1 - cyanocobalamin, 2 - riboflavin HCl

したがって、6種の混合水溶性ビタミンは、

1) 1 / 15 M リン酸緩衝液 (pH7.0): メタノール = 75 : 25 (V / V)

2) 5×10^{-3} M PIC - A 試薬を含む, 水: メタノール = 80 : 20 (V / V)

の2種類の移動相で完全分離することがわかった。

4 要 約

高速液体クロマトグラフィーにより、水溶性ビタミンの分離条件について検討した。

固定相に μ - Bondapak C_{18} を用い、移動相に

1) 1 / 15 リン酸緩衝液 (pH7.0): メタノール = 75 : 25 (V / V)

2) 5×10^{-3} M PIC - A 試薬を含む, 水: メタノール = 80 : 20 (V / V)

により、L-アスコルビン酸、ピリドキシン塩酸塩、ニコチンアミド、リボフラビン、シアノコバラミン、チアミン塩酸塩を分離することができた。

本法は、これらビタミンの調製品の分析に応用できることが判明した。

文 献

- 1) 日本ビタミン学会編: ビタミン学実験法〔 〕水溶性ビタミン, 東京化学同人 (1985)
- 2) R. B. H. Wills, G. G. Shaw, W. R. DAY: J. Chromatogr., 132, 352 (1977)
- 3) R. L. Kirchmeier, P. R. Upton: Pharm. Sci., 67, 1444 (1978)
- 4) M. Amint, J. Reusch: Analyst, 112, 989 (1987)
- 5) 出来三男: 本誌, 23, 15, (1983)
- 6) 石黒昌孝: 本誌, 23, 95, (1983)
- 7) 矢ヶ崎国秀, 加藤時信: 本誌, 25, 103 (1985)
- 8) 日本生化学会編: 生化学データブック〔 〕, 東京化学同人 (1979)