

カラムスイッチングHPLC法による血清中の脂溶性ビタミンの分析
(ビタミンA及びE)

ビタミンは、糖質、脂肪、アミノ酸等と同様に必須とされる有機化合物の栄養素です。微量で生体に生理作用しますが、ビタミン自体が生体内で十分生成されないため、食物等から摂取しなければなりません。一般に脂溶性ビタミンと呼ばれる A,D,E,F,K とその他の水溶性ビタミンに別けることができます。脂溶性ビタミンであるビタミン A(V.A)及びビタミン E(V.E)は、成長、新陳代謝、抗酸化作用等に重要な役割を果しており、これらビタミンの欠乏により成長障害、体重低下、夜盲症、不妊症や感染症に対する抵抗力の低下等を引き起こします。畜産農家にとって飼育している家畜のビタミン欠乏症が原因として起こる発育不良による肉質の低下、発病による死亡は、大きな損失となります。ビタミン欠乏症は、V.A 及び V.E を投与することにより殆ど治癒することが可能です。また、食肉用として出荷する家畜の肉質を改善する上でも、家畜の血中ビタミン濃度を把握しておくことが重要であると言えます。

V.A 及び V.E の血中濃度の測定は、HPLC 法が一般的に採用されています。しかし、従来法では、ヘキサンをを用いた血清中のタンパク質の除去、及び濃縮等の煩雑な前処理を行う必要がありました。HPLC とカラムスイッチング前処理法を組み合わせることにより、煩雑な前処理を行うことなく血清中の V.A 及び V.E を迅速に分離定量することができます。血清は、希釈液で 10 倍希釈した後、0.5 μ m のマイシヨリディスクを用いて濾過し、測定試料とします。溶媒抽出及びカラムスイッチング HPLC 法における標準添加血清での V.A 及び V.E の回収率を Table 1 に、カラムスイッチング HPLC 法における繰り返し再現性を Table 2 に示します。いずれのビタミンについても良好な回収率及び再現性が得られており、カラムスイッチング HPLC 法により迅速に血清中の V.A 及び V.E の分離定量を行うことが可能です。Fig.1 に標準及び人血清のクロマトグラム、Table 3 に測定条件、Fig.2 に装置フローダイアグラムを示します。

参考文献

- 1) Hiroyuki Moriyama, Journal of Chromatography A, 798 (1998) 125-130

Table 1 カラムスイッチングHPLC法と溶媒抽出法によるビタミンの回収率の比較

	Recovery (%)	R.S.D. (% , n=3)
Solvent extraction		
V.A (67.9 I.U./dl)	101.9	12.62
V.E (0.39 μ g/ml)	118.5	3.21
On-line HPLC		
V.A (74.0 I.U./dl)	102.8	2.48
V.E (0.51 μ g/ml)	85.9	1.44

Table 2 カラムスイッチングHPLC法によるV.A,V.Eの繰り返し再現性

Repeatability (R.S.D.,%,n=6)		
Standard sample spiked in serum		
V.A		
	16.7 (I.U./dl)	1.25
	333 (I.U./dl)	0.26
V.E		
	0.434 (μg/dl)	1.12
	8.63 (μg/dl)	0.35
Human serum		
V.A		0.98
V.E		0.65

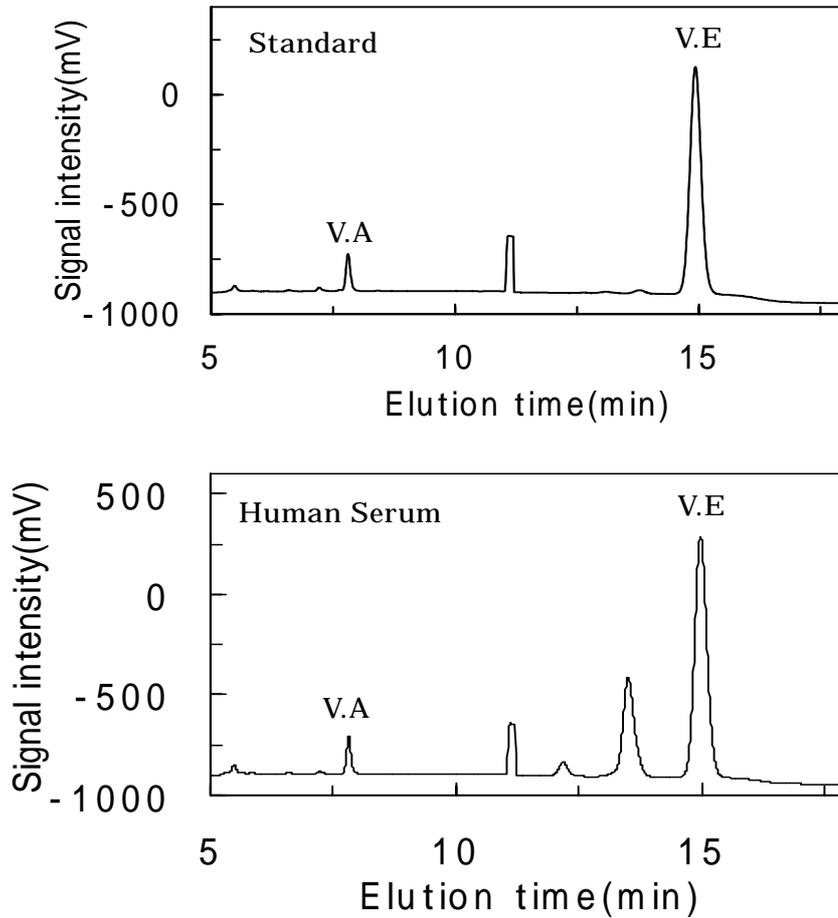


Fig.1 カラムスイッチング HPLC 法による標準及び人血清の V.A,V.E のクロマトグラム

Table 3 カラムスイッチング HPLC 法における測定条件

分析カラム ; TSKgel ODS-80Ts (4.6mmID × 15cm)(品番 17201)
 ガードカラム ; TSKguardgel ODS-80Ts(品番 17242), (カートリッジホルダ品番 14100)
 前処理カラム ; TSKprecolumn BSA-ODS/S (4.6mmID × 1.0cm)(品番 18578)
 分析液流速 ; 1.0ml/min
 前処理液流速 ; 1.5ml/min
 溶離液 ; A液 H₂O/EtOH(20/80)
 ; B液 H₂O/EtOH(13/87)
 前処理液 ; H₂O/EtOH(80/20)
 洗浄液 ; EtOH
 試料注入量 ; 300 μl(ループ固定注入方式)(希釈液にて 10 倍希釈)
 測定温度 ; 40 (分析カラム) 室温(前処理カラム)
 検出波長 ; ex. 340nm(ビタミン A)
 em. 460nm
 ex. 298nm(ビタミン E)
 em. 325nm

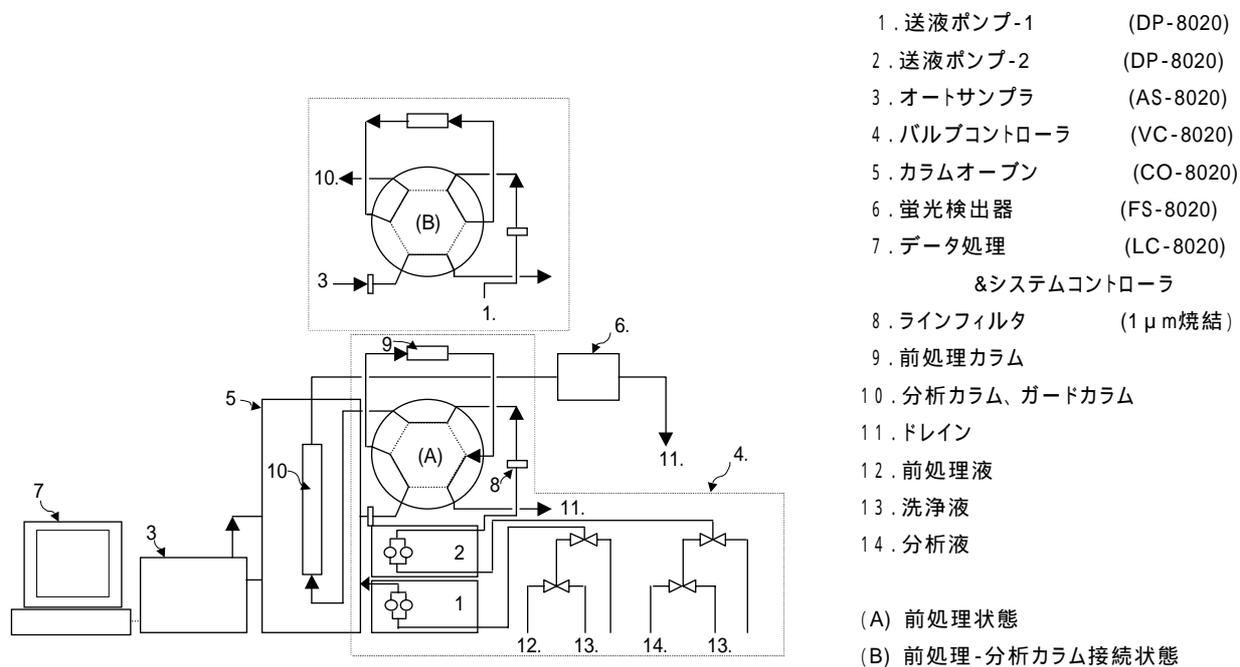


Fig.2 カラムスイッチング HPLC 法のシステムフローダイアグラム