

Application News

No. L501A

超臨界流体クロマトグラフィー
Supercritical Fluid Extraction / Chromatography

オフライン SFE-SFC-PDA による 市販サプリメント中のビタミン E の分析

Application of Off-line SFE/SFC/PDA for Vitamin E in Commercial Supplement

ビタミン E は脂溶性ビタミンの一つで、トコフェロールとも呼ばれ、特にヒトの体内で抗酸化作用を発現する重要な化学物質です。トコフェロールには、メチル基の数と位置によって α , β , γ , δ の 4 種があります。抗酸化作用の活性は、 α -トコフェロールが最も強く、市販のビタミン剤などの多くのサプリメントにはビタミン E として α -トコフェロールが配合されています。脂溶性の高い成分であることから、超臨界流体を用いた迅速、簡便な抽出法の適用が期待されます。ここでは超臨界流体を用いた α -トコフェロールの抽出操作 (SFE) をご紹介します。

Y. Watabe H. Terada

■オフライン SFE システム

Off-line SFE System

すでにオンライン SFE-SFC システムのご紹介はアプリケーションニュースで行っておりますが、SFC 以外の既存の分析法と組み合わせたいとの要望も多く、試料の取り扱いの自由度の高さから SFE 部分にも注目が集まっています。SFE には次のような特長があります。

1. 超臨界流体の高い透過性と拡散速度による迅速かつ高効率抽出
2. 温和な温度条件、遮光処理による不安定化合物の抽出
3. 溶媒抽出に比べて低コスト
4. 抽出作業の完全自動化
5. 抽出試料の取り扱いが容易
6. さまざまな分析法に対応可

以下の Fig. 1 にオフライン SFE システムの流路構成を示します。

背圧制御ユニット BPR より上流側が超臨界状態になり、SFE ユニット内のバルブを制御して、超臨界流体をベッセルに封入するスタティック抽出とベッセルを通過させるダイナミック抽出により、迅速かつ高効率に目的成分の抽出を行うことが可能です。

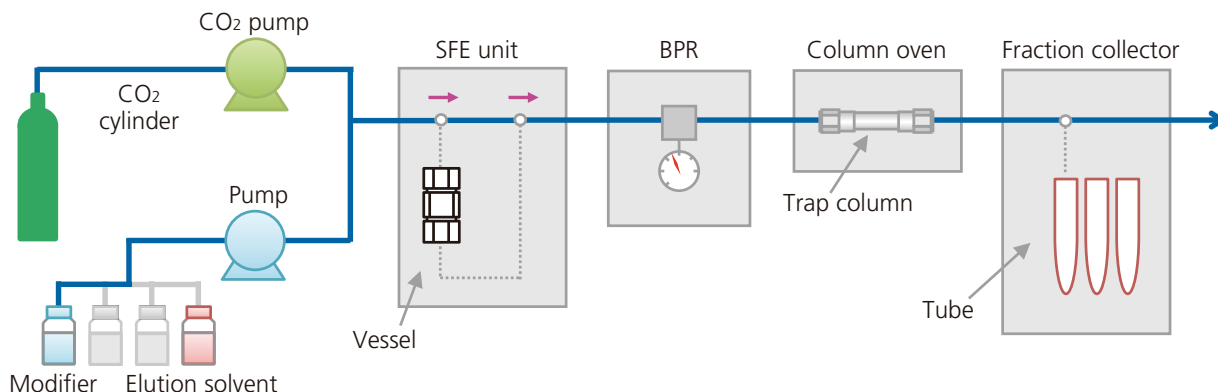


Fig. 1 オフライン超臨界流体抽出 (SFE) システムの流路構成
Flow Diagram of Super Critical Fluid Extraction (SEF) System

送液システムには低圧 GE バルブを組み込んだ HPLC 用ポンプを採用しており、試料ごとにモディファイアの種類 (トラップカラムからの溶出液を含め最大 4 種類) や二酸化炭素に対する濃度を変化させて、最適条件で抽出操作を行うことが可能です。抽出物はトラップカラムに保持され、送液ポンプの低圧バルブをトラップカラムから溶出させるのに適した溶媒に切り換えて溶出させ、フラクションコレクターを用いて試験管に分取します。

■ α -トコフェロールの SFE 処理

SFE Treatment for α -Tocopherol

実試料である、市販サプリメントはカプセルの中身がペースト状で、吸湿している可能性もあり、Fig. 2 に示すように弊社より販売している SFE 用の脱水剤である "MIYAZAKI Hydro-Protect" 1 g にペースト状サプリメント 275 g を加えて混和し、SFE 用抽出ベッセルにセットしました。

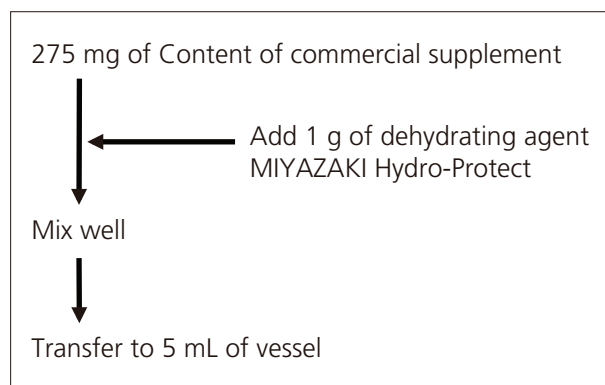


Fig. 2 サプリメントの SFE 前の予備的前処理手順
Preliminary Pretreatment for Supplement Sample before SFE

SFE に用いた条件を以下の Table 1 に示します。カラム選択検討から、分析カラムを Shim-pack™ UCX-SIL と決定し、オンライン SFE/SFC 分析での各種条件の最適化を行い、以下の Table 2 に示す条件で分析を行いました。

Table 1 α -トコフェロールの SFE 条件
SFE Conditions for α -Tocopherol

Offline SFE:	
Extraction Vessel	: 5 mL
Extraction Solvent	: CO ₂
Flow Rate	: 5 mL/min
Temperature	: 40 °C
Back Pressure	: 15 MPa
Extraction Time	: 15 min (Static 2 min → Dynamic 3 min) × 3 times
Trap & Pressure Down Conditions	
Trap Column	: Shim-pack VP-ODS (50 mm L. × 4.6 mm I.D.)
Temperature	: 60 °C
Pressure Down Time	: 10 min (15 - 25 min)
Recovery Conditions	
Elution Solvent	: <i>n</i> -Hexane
Flow Rate	: 2 mL/min
Temperature	: 60 °C
Fraction Time	: 3.5 min (25 - 28.5 min)

■ サプリメント中の α -トコフェロールの SFE 評価 Evaluation SFE for α -Tocopherol in Supplement

オフライン SFE で得られた α -トコフェロールの抽出物について、Table 2 の条件で SFC を行い、抽出操作についての評価を行いました。尚、抽出物はヘキサンで 10 mL に定容した後、SFC 分析に供しました。Fig. 3 に代表的な SFC クロマトグラムを示します。

Table 2 α -トコフェロールの SFC 条件
SFC Conditions for α -Tocopherol

SFC Conditions:	
Column	: Shim-pack UC- Choles (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μ m)
Flow Rate	: 3 mL/min
Modifier	: 2 - propanol
Gradient	: 2 % (0 min) - 20 % (10 min) - 50 % (10 - 12 min)
Temperature	: 40 °C
Back Pressure	: 15 MPa
Injection Volume	: 2 μ L

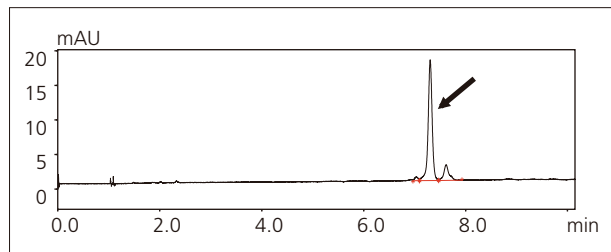


Fig. 3 SFE で得られたサプリメント中の α -トコフェロールの SFC 分析
SFC Analysis for α -Tocopherol Obtained by SFE from Supplement

Shim-packは株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

まず、オフライン SFE の評価に用いた α -トコフェロールの SFC 条件の妥当性評価を標準品を用いて行いました。試料濃度 0.5 μ g/L から 2.0 μ g/L の範囲での直線性と 1.0 μ g/L 濃度の試料での再現性を示します。良好な直線性と保持時間、ピーク面積、ピーク高さの十分な再現性が得られました。

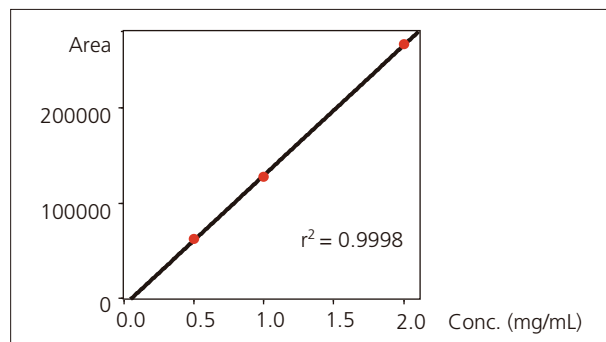


Fig. 4 標準 α -トコフェロールの SFC での直線性
Linearity for Standard α -Tocopherol Obtained by SFC

Table 3 標準 α -トコフェロールの SFC での再現性 (n=6)
Repeatability for Standard α -Tocopherol Obtained by SFC

No	Retention Time (min)	Area	Height
Average	7.242	127,338	19,682
RSD (%)	0.057	0.573	0.274

以下の Table 4 に繰り返し SFE 処理により得られた α -トコフェロールの定量値の再現性と理論値 (7.4 mg) に対する回収率を、Fig. 5 に得られたクロマトグラムを重ね書きしたものを示します。一回の抽出のみで良好な回収率と再現性が確認でき、オフライン SFE がビタミン E 類の抽出に有効であることが確認できました。

Table 4 サプリメント中の α -トコフェロールの SFE における再現性と回収率
Repeatability and Recovery of α -Tocopherol in Supplement by SFE

No	Conc. (mg/mL)	Recovery (%)
1	0.776	104.46
2	0.780	105.00
3	0.772	103.92
4	0.790	106.35
5	0.761	102.44
6	0.758	102.04
Average	0.773	
RSD (%)	1.549	

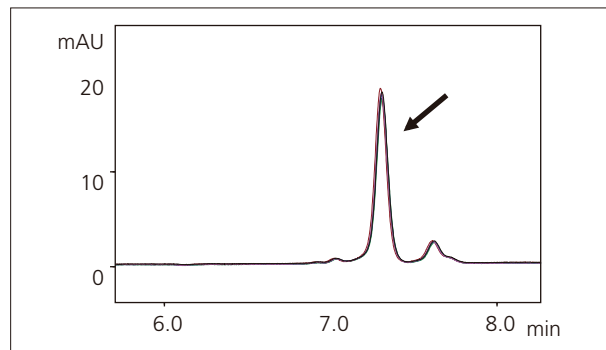


Fig. 5 SFE 後の α -トコフェロールの重ね描きクロマトグラム
Overlaid Chromatograms of α -Tocopherol after SFE