

Application News

No. C190

超臨界流体クロマトグラフィー

Nexera™ UC 超臨界流体クロマトグラフを用いた脂質類の分離

脂質は生体由来で有機溶媒に溶解する化合物を指すことが多く、リン酸基や糖などの極性基を構造に持つ複合脂質と脂肪酸やアシルグリセロールなどの単純脂質など非常に多くの種類が存在しています。それらは構造上に共通した官能基を持つ脂質クラスとして分類され、クラスの違いで物性が大きく異なります。また、同一の脂質クラスでも、構成される脂肪酸の異なる分子種が存在します。したがって、脂質分析には高い分離能が要求されることが多く、HPLC では分離の目的により、順相モードと逆相モードが使い分けられています。一般的に脂質クラスで分離を行う際には順相モードが、分子種の分離を行う際には逆相モードが使用されています。両モードは用いる移動相が全く異なり、切り換えて分析を行うのは非常に煩雑です。ここでは固定相の異なる様々なカラムを用いた超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) による分離についてご紹介します。

H. Terada, T. Hattori

■対象成分と分析条件

表 1 に示す 10 種類の脂質クラスの異なる脂質成分をジオール、シリカゲル、ODS と極性基内包型 ODS の 4 種類の異なる固定相カラムを用いて分離を行い、保持挙動を確認しました。それぞれの構造式を図 1 に示します。質量分析計の MRM 条件と SFC の分析条件をそれぞれ表 1 と表 2 に示します。1 $\mu\text{mol/L}$ の標準試料を分析した際のクロマトグラムを図 2~5 に示します。

表 1 対象成分および MRM 条件

Standard	Conc. ($\mu\text{mol/L}$)	MRM Transition (Positive)	Mode
PC 17:0/17:0	1	762.60>184.00	+
PE 17:0/17:0	1	720.55>579.55	+
PI 14:1/17:0	0.5	811.95>534.95	-
PG 17:0/17:0	1	768.50>579.40	+
PS 17:0/17:0	1	764.50>579.40	+
SM d18:1/17:0	1	717.60>184.00	+
MG 17:0	1	362.30>327.30	+
DG 12:0/12:0	1	474.40>439.40	+
TG 17:0/17:0/17:0	1	866.80>579.50	+
Cer d18:1/17:0	1	552.50>264.30	+

表 2 分析条件

Column	No.	Column	Size
Column	1	Shim-pack™ UC-Diol	150 mm L. 2.1 mm I.D. 3 μm
	2	Shim-pack™ UC-Sil	
	3	Shim-pack™ UC-GIS II (ODS)	
	4	Shim-pack™ UC-RP (極性基内包型 ODS)	
Mobile phase	: A; CO_2 B; 0.1 % (w/v) Ammonium formate in methanol		
Gradient	: B.conc. 5 % (0 min) - 40 % (12-14 min) - 5 % (14.1-17 min)		
Flow rate	: 0.8 mL/min		
Column temp.	: 40 $^\circ\text{C}$		
BPR pressure	: 10 MPa		
Detector	: LCMS™-8050 (ESI, MRM mode)		
Makeup	: 0.1 % (w/v) Ammonium formate in methanol		
Makeup flow rate	: 0.05 mL/min		
Injection vol.	: 1 μL		

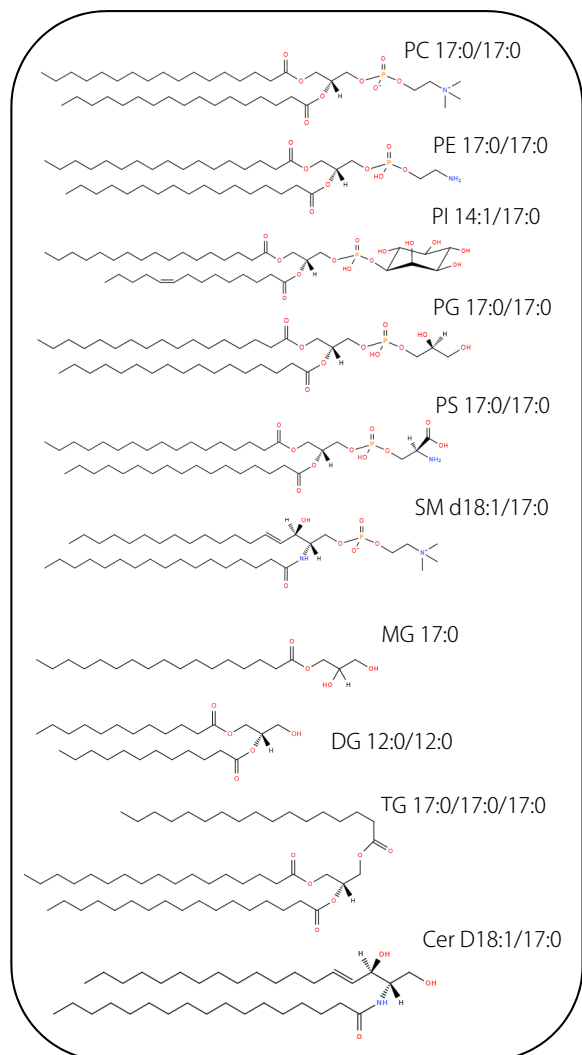


図 1 脂質の構造式

■クロマトグラム

図2~5より、固定相の違いにより保持挙動やピーク形状が大きく異なることがわかります。ジオールとシリカゲルはHPLCでは順相モードで用いられ、SFCにおいても両者の保持挙動は比較的似ていますが、シリカゲルでは特異的に固定相に吸着することがあります。ODSと極性基内包型ODSはHPLCでは逆相モードとして用いられ、対象成分の疎水性が高くなると保持が大きくなる傾向があります。SFCにおいても同様の傾向がありますが、極性基内包型ODSでは、ODS基による逆相的な保持だけでなく、極性基による順相的な保持がはたらくことがあります。ODSなどの逆相固定相において、アシルグリセロールはMG、DG、TGの順で溶出していますが、ジオールなどの順相固定相ではTG、DG、MGの順番で溶出しており、両方で溶出の順序は逆になります。このようにSFCでは、同じ移動相を使用して、順相と逆相固定相を用いることができるため、多様な分離が期待できます。

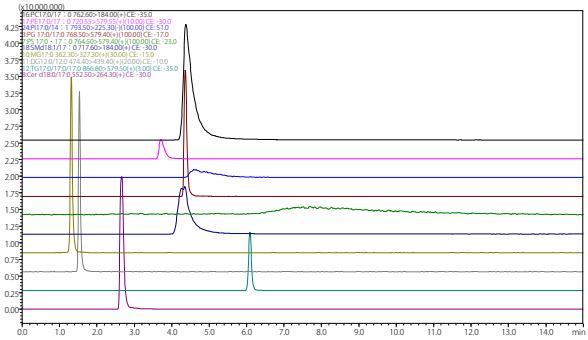


図4 ODS固定相によるクロマトグラム

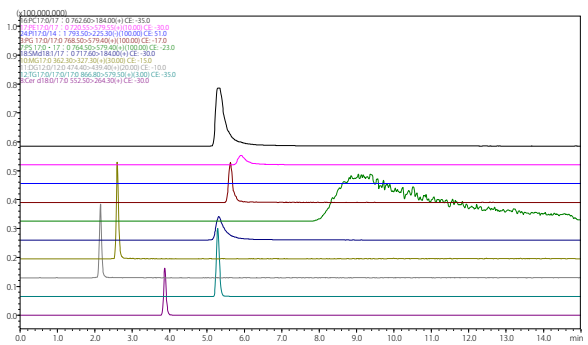


図5 極性基内包型ODS固定相によるクロマトグラム

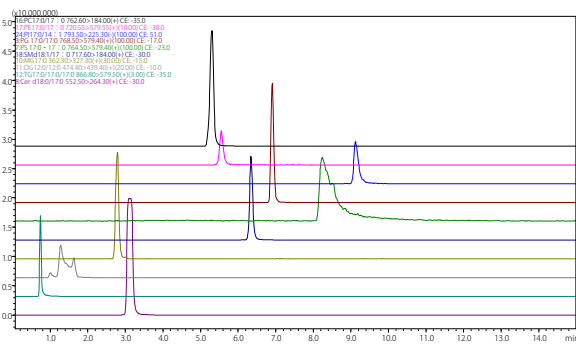


図2 ジオール固定相によるクロマトグラム

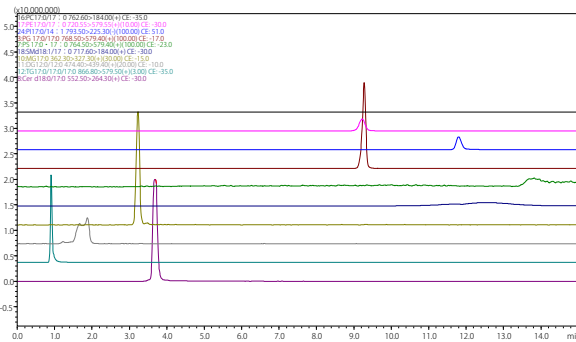


図3 シリカゲル固定相によるクロマトグラム

Nexera、Shim-pack、およびLCMS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。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年3月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。