

LC TALK

Vol. 111
April 2020



Talk クロマトグラフィーに美しさを求めて …… P. 2

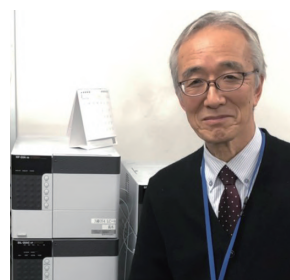
Applications 魚肉の鮮度、腐敗状態の迅速測定
魚肉中のATP関連物質、ヒスタミンおよびアミノ酸の同時分析 …… P. 4

Products セミ分取 超臨界流体クロマトグラフ Nexera UC Prep …… P. 8

TEC セミ分取超臨界流体クロマトグラフ用 LotusStreamセパレーター …… P. 11

Talk

クロマトグラフィーに美しさを求めて



公益財団法人日本食品油脂検査協会
板橋 豊

● はじめにー油脂との出会いー

大学の卒論研究で魚油化学を探究する研究室を選んだのが筆者と油脂（脂質）との最初の出会いです。魚の油に特別関心があったわけではなく（EPAやDHAがヒトの健康維持に有益なことが分かる前の時代でしたので）、希望者が少なく入りやすかったことと物理化学的な実験やフィールドワークよりも研究室での有機化学的な実験の方が自身に向いていると思ったのが理由でした。こうして、一番不人気だった研究室を競争倍率0.6くらいで選んだことが、結果としてその後の研究人生を決めることになりました。名前からして魚臭そうな研究室で魚油（高度に精製した魚油は無臭です）と有機溶剤臭のコラボの中で始まった卒論研究は、その後、扱った試料は鯨から微生物まで広がり、また分離分析機器もガスクロ（GC）から始まって、液クロ（HPLC）、マス（MS）、そして最後はキャピラリー電気泳動装置まで揃えて大学を退職したのが数年前でした。その後も油には縁があって現在に至っています。皆さんは、魚油化学なんて化学があるのかと思われるかもしれませんが。私自身もそう思いながら、栄養学的には重要な分野であっても基礎化学としては有機化学のごく一部、地味な学問と思いながら魚油や他の水産生物の油を扱ってきました。ところが数年前、新聞に、1958年のノーベル化学賞の選考で油脂化学を専門とした外山修之名古屋大学名誉教授が「海産動物油の研究」で候補になっていたという記事が出て驚きました。残念ながら外山先生は受賞には至りませんでした。50年経って開示された選考資料は、油脂化学関係者とりわけ現役の研究者を元気づけた嬉しい話題でした。

● 液クロがやってきた

院生になったとき、名古屋大学工学部から外山先生の弟子である高木徹先生が赴任されて指導を受けることになりました。研究室にあった主なクロマト機器はGCだけでした

ので、その中の「Shimadzu GC-6AM」を使って、魚油や他の生物由来脂質の異性体分析、組成分析、新規分析法の開発を目的として本格的な研究を始めました。現在多くの分野ではGCよりもHPLCが広く使われています。油脂・脂質の分野も例外ではありませんが、それでも特に脂肪酸分析は今もGCの独壇場です。理由は複雑な脂肪酸混合物（魚油では数十成分）を他のどんな機器よりも見事に分離するためです。GC-6AMは私にとって研究の原点で出会い、ときにトラブルに見舞われながらも30年も使い続けた手放し難い機器でした。単に使ったというより使い倒した感じです。

大学院を修了する頃、液クロが研究室にやってきました。初めて目にしたHPLC装置の名は「Shimadzu-DuPont LC-1」。移動相貯槽を2つ内蔵し、GCで使用するよりも大きなエアークOMPRESSORを用いて移動相を送液するため、駆動音が非常に大きく、今でもその音が耳に残っています。UV検出器が付随していたことから、このLCを使って何か分析してみようということになって選んだサンプルが共役脂肪酸でした。共役脂肪酸は反芻動物やある種の植物種子に含まれる希少脂肪酸ですが、単一成分ではなく種々の異性体が存在します。今日では共役脂肪酸は抗腫瘍性や抗肥満性などの生物活性を有するために注目されていますが、当時はその存在は知られていなかったものの機能性が話題になることはほとんどありませんでした。筆者らは、LC-1とGC-6AMを使用して、それまでクロマトでの分析が難しかった共役トリエン脂肪酸（ザクロやゴーヤなどの限られた植物の種子に存在します）のシス・トランス異性体と二重結合位置異性体の分析を可能にしました（Takagi, Itabashi (1981) *Lipids* 16, 546-551）。これがHPLCを使用した筆者の最初の研究になりました。この結果は、その後の共役脂肪酸研究の発展に繋がったと思います。

● 鏡像異性体との出会い

その後、研究室のLCは更新されてLC-6Aになりました。30歳代半ば、もう一人の恩師であるトロント大学のArniss Kuksis教授から「脂質分析において未解決の課題が2つある。その1つがグリセロ脂質の鏡像異性体の分析であるが、君ならできるだろう」と言われてその気になって、鏡像異性体の分離に取り組みました。キラルHPLC分析を試行錯誤して（住友化学の大井尚文博士の開発されたキラルカラムと関連論文が大いに参考になりました）、最初にモノアシルグリセロール（乳化剤や抗菌剤等として食品、医薬品、化粧品等の分野で広く利用されています）の鏡像異性体の分離に成功したときの感動は忘れられない思い出になりました。この成果は、その後のキラル脂質研究の発展に繋がりました（Itabashi, Kuksis (2016) in *Encyclopedia of Lipidomics*, Springer）。キラルHPLC法により、種々の脂質成分の鏡像異性体の精密分析が可能となり、グリセロ脂質の代謝に関する酵素（リパーゼ、アシルトランスフェラーゼ等）の立体特異性の決定、糖脂質やエーテル脂質の絶対配置の決定及びトリアシルグリセロール（TAG）の立体特異分析（脂肪酸のsn-1、2、3位の決定）等が正確かつ容易に行えるようになりました。一方、TAGやホスファチジルコリン（PC）など生物における主要な脂質成分のキラル分離は未解決の課題として残されましたが、近年著しく進歩した多糖類（セルロース、アミロース）系のキラル固定相を使用することによって解決されつつあります。脂質のキラル分離は、これまで間接的に分析され推測されてきたTAGやリン脂質などの鏡像異性体の生物組織における存在の有無を直接知ることが可能であることを意味しており、今後脂質鏡像異性体の生体での分布、役割について新たな知見の得られることが期待されています。

● こだわり

似て非なるものを美しいまでに完璧に分けることにこだわって油脂成分（異性体）のクロマト分析を行ってきました。エナンチオマー（鏡像異性体）やジアステレオマーの完全な分離を達成した時のクロマトグラムをみて綺麗だと思いました。170年ほど前に、パスツールが虫メガネとピンセットを

使って酒石酸アンモニウムナトリウムの光学分割を達成したことを有機化学の教科書で勉強し、ラセミ体は鏡像異性体の等量混合物であるということは頭で理解していても、実際それを自らの方法で知った時の感動は格別でした。研究生活には、いろいろな喜びがあります。論文が良いジャーナルに掲載されたとか、何か賞を頂いたとか、あるいは昇進したとか、喜びの感じ方は人それぞれだと思いますが、筆者にとっては、院生や助手だった若い時に、異性体分析の実験に没頭し、ようやく綺麗なクロマトグラムを得た時に背筋がぞくつと震えるような感動を覚えたことが一番大きな喜びでした。

● おわりに

脂質は細胞膜の基本成分として、またエネルギー源として生体において重要な役割を担っています。その特徴は、二重結合数、二重結合位置、アシル基位置などの異なる多数の異性体と同属体の混合物であり、極めて複雑な組成（Lipidome）を示すことです。このため、分析機器や分析法の発達した今日であっても、分離が困難なために生体における分布や機能の不明な成分が多数存在します。こうした問題を解決していくために、より精密な分析法の開発が常に求められています。リピドームを網羅的かつ包括的に解析するリピドミクス（lipidomics）は、プロテオーム解析を補完するものとして、近年、目覚ましい発展を遂げています。プロテオミクス研究にMSが不可欠であるように、リピドミクス研究においてもMSは主導的な役割を果たしています。しかしながら、MSで鏡像異性体を識別することは難しく、また位置異性体や幾何異性体を区別することも多くの場合困難です。クロマトグラフィーはこうした問題の解決に役立ちます。キラルHPLCとMSを併用することによって、脂質の精密な分析が可能になることが期待されます。リン脂質やTAGに特有の立体異性体や位置異性体を正確に分析することは細胞や組織で起こる生理的变化（病態等）を解析する上で、また油脂の代謝と栄養生理を考える上で不可欠であり、その手段としてクロマトグラフィーとMSは重要な役割を担っています。若い方々の努力によって、この分野が一層発展することを願っています。

執筆者紹介

1975年北海道大学水産学部水産化学科卒業、1980年北海道大学大学院水産学研究科博士課程修了、1980年～1981年日本学術振興会奨励研究員、1981年～1991年北海道大学助手（水産学部）、1991年～1999年北海道大学助教授（水産学部）、1999年～2013年北海道大学教授（水産学部、水産科学研究科、水産科学研究院）、2013年～2015年北海道大学特任教授（水産科学研究院）、2018年公益財団法人日本食品油脂検査協会理事長、北海道大学名誉教授

専門分野 油脂化学、分析化学

将来の夢 とりあえず元気で
あること

趣味 絵画、花、オペラ、テレビ、盆踊り、猫、お酒
(いずれも見ただけ、聴くだけ、飲むだけ)

Applications

魚肉の鮮度、腐敗状態の迅速測定

魚肉中のATP関連物質、ヒスタミンおよびアミノ酸の同時分析

グローバルアプリケーション開発センター
岩田 奈津紀

魚介類の筋肉は畜産動物に比べ、組織が軟弱で水分が多いため、腐敗が早いことで知られています。魚介類の鮮度を正確に判定することは、食の安心安全の面で非常に重要となります。動物の筋肉のエネルギー源であるATP（アデノシン三リン酸）の変化を筋肉の鮮度低下の指標とする方法も広く利用されており、魚肉の鮮度を数値で評価する場合にはK値がよく利用されています。

一方で、近年不揮発性腐敗アミンであるヒスタミンによる食中毒からアレルギーを発症する事例も報告されています。マグロなどの赤身魚が腐敗すると、ヒスタミン（アミノ酸の一種であるヒスチジンの代謝物）が高濃度に蓄積されます。ヒスタミンは熱に安定であり、また調理加工工程で除去できないため、一度生成されると食中毒を防ぐことはできません。このため、国際食品規格委員会（Codex）や欧州をはじめとする各国では、ヒスタミン濃度の基準が設定されています。

LCtalk Vol. 108では、魚肉のK値を測定し、鮮度の経時変化についてマルチデータレポートを作成した例をご紹介しました。ここでは、Nexeraデュアルインジェクションシステムを用いて、鮮度指標であるK値、腐敗状態の指標であるヒスタミンを同時分析した例をご紹介します。なお、今回の分析条件では、魚肉に含有されるうまみをはじめとする栄養成分で知られるアミノ酸、核酸も同時分析可能でした。

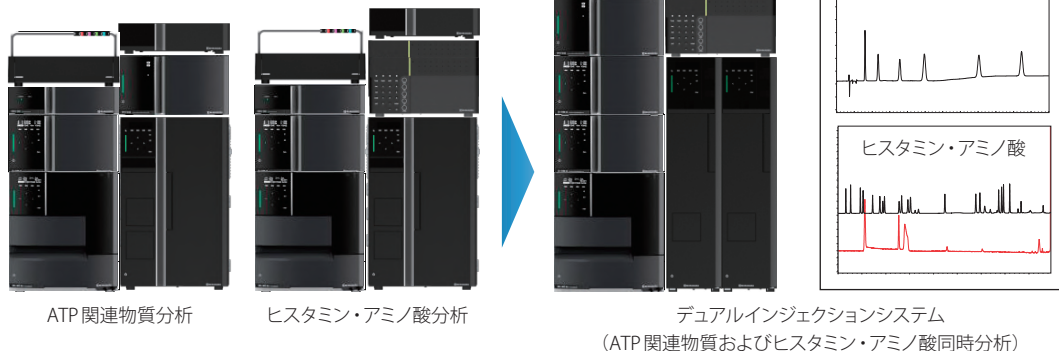


図1 Nexera デュアルインジェクションシステム

1. デュアルインジェクションシステム

一般に、ATP関連物質およびヒスタミンを含むアミノ酸を分析する際には、移動相、分析カラム、検出器などの分析条件が異なるため、HPLC装置2台を用いてそれぞれを分析するか、1台のHPLC装置で分析を2回実施する必要があります。しかし、鮮度や腐敗状態のように、サンプルが経時変化するものに対しては、できる限り迅速に結果を得ることが求められます。

Nexeraデュアルインジェクションシステムでは、独立した2つの流路にそれぞれサンプルを注入することにより、系統の異なる分析を同時に行うことが可能です。また、得られた2つの分析データは、1つのデータファイルに格納されるため、同一サンプルに対する統合的な解析とデータ管理が容易になります（図1）。

今回の検討では、ATP関連物質はフォトダイオードアレイ（PDA）検出器（SPD-M40）で、ヒスタミンとアミノ酸は蛍光検出器（RF-20Axs）で検出しました。

2. 対象成分

対象成分は、ATP関連物質6成分、ヒスタミンおよびアミノ酸24成分（タンパク質構成20成分と魚肉に関連する成分4成分）の計31成分です。表1に対象成分を示します。

表1 対象成分

ATP関連物質		ヒスタミン・アミノ酸		13	ヒスチジン (His)	20	カルノシン (Car)	27	フェニルアラニン (Phe)
1	ヒポキサンチン (Hx)	7	アスパラギン酸 (Asp)	14	スレオニン (Thr)	21	チロシン (Tyr)	28	イソロイシン (Ile)
2	イノシン5'-リン酸 (IMP)	8	グルタミン酸 (Glu)	15	β -アラニン (β -Ala)	22	バリン (Val)	29	ロイシン (Leu)
3	イノシン (HxR)	9	アスパラギン (Asn)	16	アルギニン (Arg)	23	メチオニン (Met)	30	リジン (Lys)
4	アデノシン5'-リン酸 (AMP)	10	セリン (Ser)	17	アラニン (Ala)	24	ヒスタミン (Him)	31	プロリン (Pro)
5	アデノシン5'-リン酸 (ADP)	11	グルタミン (Gln)	18	タウリン (Tau)	25	シスチン (Cys)		
6	アデノシン5'-三リン酸 (ATP)	12	グリシン (Gly)	19	アンセリン (Ans)	26	トリプトファン (Trp)		

3. 前処理および分析条件

サンプルには、マグロを用いました。前処理は、LCtalk Vol. 108、5頁図3中の「上清10 mL」以下を図2に示すように変更して行いました。

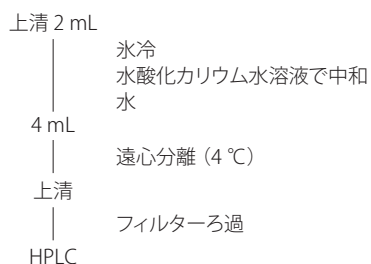


図2 前処理手順（過塩素酸水溶液により3回抽出後）

ヒスタミンを含むアミノ酸分析は、*o*-フタルアルデヒド (OPA) / β -メルカプトプロピオン酸 (MPA) およびクロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) を用い（表2）、オートサンプラーによる自動プレカラム蛍光誘導体化を行いました（表3）。

表4に、分析条件を示します。ATP関連物質の分析はイソクラティック溶離で分離することが多いですが、グラジエント溶離を行うことにより、多検体分析において繰り返し安定した結果が得られる条件としました。

表4 分析条件

装置	Nexera デュアルインジェクションシステム	装置	Nexera デュアルインジェクションシステム
カラム	Shim-pack GIST 3 μ m C18 AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μ m)	カラム	Shim-pack Velox C18 (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.7 μ m)
流量	0.8 mL/min	流量	0.8 mL/min
移動相	A) 0.15 mol/L リン酸、0.225 mol/L トリエチルアミンを含む水/アセトニトリル=100/1 (v/v) B) 0.15 mol/L リン酸、0.225 mol/L トリエチルアミンを含む水/アセトニトリル=80/20 (v/v) グラジエント溶離 B濃度 0% (0-4 min) \rightarrow 12% (11.5 min) \rightarrow 100% (11.51-18.5 min) \rightarrow 0% (18.51-32 min)	移動相	A) 20 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) B) アセトニトリル/メタノール/水=45/40/15 (v/v/v) グラジエント溶離 B濃度 5% (0 min) \rightarrow 13% (8 min) \rightarrow 25% (15 min) \rightarrow 52% (21.5 min) \rightarrow 100% (21.51-27.50 min) \rightarrow 5% (27.51-32 min)
温度	30 $^{\circ}$ C	温度	35 $^{\circ}$ C
注入量	10 μ L	注入量	1 μ L
検出器	フォトダイオードアレイ検出器 260 nm	検出器	蛍光検出器 励起 350 nm、蛍光 450 nm (Ch1) 励起 266 nm、蛍光 305 nm (Ch2)

表2 誘導体化試薬の調製

MPA 溶液

0.1 mol/L ほう酸緩衝液 10 mL に 3-メルカプトプロピオン酸 10 μ L を加えて混合

OPA 試薬

o-フタルアルデヒド 10 mg をエタノール 0.3 mL に溶解し、0.1 mol/L ほう酸緩衝液 0.7 mL と超純水 4 mL を加えて混合

FMOC 試薬

クロロギ酸 9-フルオレニルメチル 10 mg をアセトニトリル 50 mL に溶解

表3 自動プレカラム誘導体化の手順

- ① MPA 溶液 20 μ L
- ② OPA 試薬 20 μ L
- ③ サンプル 10 μ L
- ④ 攪拌
- ⑤ FMOC 試薬 5.0 μ L
- ⑥ 攪拌
- ⑦ 注入

なお、今回サンプルバイアルには、低吸着ガラスバイアル TORAST-H Glass Vial を用いました。本バイアルは、1.5 mL と小容量の 150 μ L の 2 種類があります。誘導体化試薬と誘導体化前の試料には、1.5 mL バイアルを用い、試料と誘導体化試薬を反応させるバイアルには、少量でも混ざりやすい 150 μ L バイアルを用いました。

図3に、オートサンプラーへのサンプルセット例を示します。Nexeraのオートサンプラー SIL-40シリーズは、サンプルラックを3個設置できるので、図3のように用途別にバイアルをセットすることにより、サンプルセットミスを防ぐことができます。

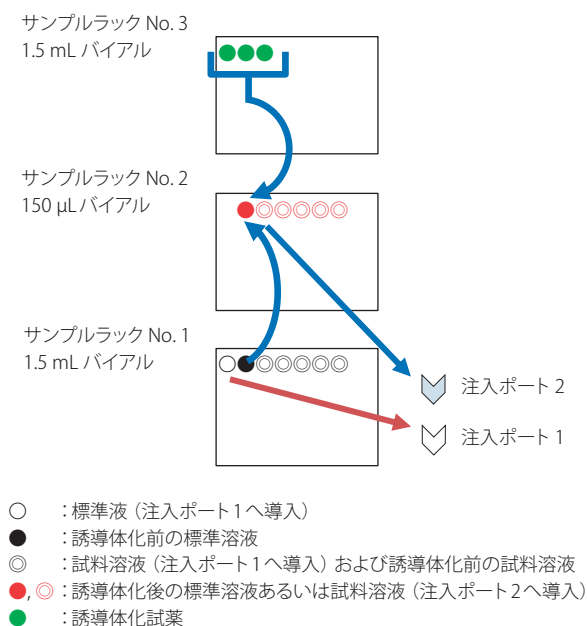


図3 オートサンプラーへのサンプルセット例

4. 前処理抽出溶媒の検討と添加回収率の確認

過塩素酸にてATP関連物質を抽出する前処理方法は以前から報告されていますが、ヒスタミンやアミノ酸についても同様に抽出されるか検討しました。操作blankとして、水と過塩素酸にてそれぞれヒスタミン、ヒスチジンを各1 µmol添加し抽出したところ、いずれも過塩素酸の場合に安定した抽出効率が得られました (表5)。

また、マグロを用いて、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に基づき、6併行の添加回収試験を実施しました。ヒスタミンをCodexの基準値濃度 (10 mg/100 g) になるように添加し、30分静置後、6サンプルを同時に前処理しました。

表6に、添加回収試験結果を示します。真度 (回収率の平均値)、併行精度ともに良好な結果となりました。

表5 抽出溶媒の違いによるヒスタミンとヒスチジンの抽出効率

n	抽出効率 (%)			
	ヒスタミン		ヒスチジン	
	水	過塩素酸	水	過塩素酸
1	84.0	97.7	93.8	92.5
2	100.8	95.7	102.1	93.0

表6 ヒスタミンの添加回収試験 (n=6)

n	回収率 (%)
1	96.8
2	98.3
3	99.8
4	99.8
5	101.0
6	103.0
平均	99.8
%RSD	2.14 %

5. 検量線

対象の31成分について検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率 $r^2=0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。

6. 魚肉中対象成分一斉分析とK値、ヒスタミン濃度測定

生のはだマグロを用い、購入直後に前処理したものと、保存温度を変更して1日後に前処理したものを分析し、K値とヒスタミン濃度を確認しました。保存温度は、冷蔵 (4 °C) 保存と室温 (25 °C) を検討しました。購入直後と購入1日後 (4 °C 保存) を比較すると、K値はわずかに上昇 (+2.6 %) し、鮮度の経時変化が認められました。また、保存温度を比較すると、25 °C 保存ではK値は大幅に上昇 (+25.1 %) し、鮮度が落ちましたが、ヒスタミンは生成されませんでした。

同様に、購入後6日間、冷蔵保存した生のはだマグロについても、K値とヒスタミン濃度を確認しました。その結果、K値は70.4 %と腐敗と言われる領域にまで上昇し、かつCodex基準値以下のヒスタミンが検出されました。濃度は、2.1 mg/100 gでした。図4に標準液およびマグロを分析したクロマトグラムを、表7に経過日数、保存温度におけるマグロのK値とヒスタミン濃度を示します。また、ヒスタミンは多数のアミノ酸と分離検出でき、魚肉に多いとされるヒスチジン、アラニン、タウリン、アンセリン、カルノシン、リジンなどの成分も同時に分析可能でした。表8に、魚肉中に多いとされる核酸、アミノ酸について、各成分の濃度を示します。

表7 経過日数、保存温度におけるマグロのK値とヒスタミン濃度

	経過日数	保存温度 (°C)	K値* (%)	ヒスタミン (mg/100 g)
きはだマグロ	0	4	36.1	N.D.
		25	61.2	N.D.
	1	4	38.7	N.D.
びんちょうマグロ	6	4	70.4	2.1

* K値の定義式

$$K値 = \frac{Hx + HxR}{Hx + HxR + IMP + AMP + ADP + ATP} \times 100$$

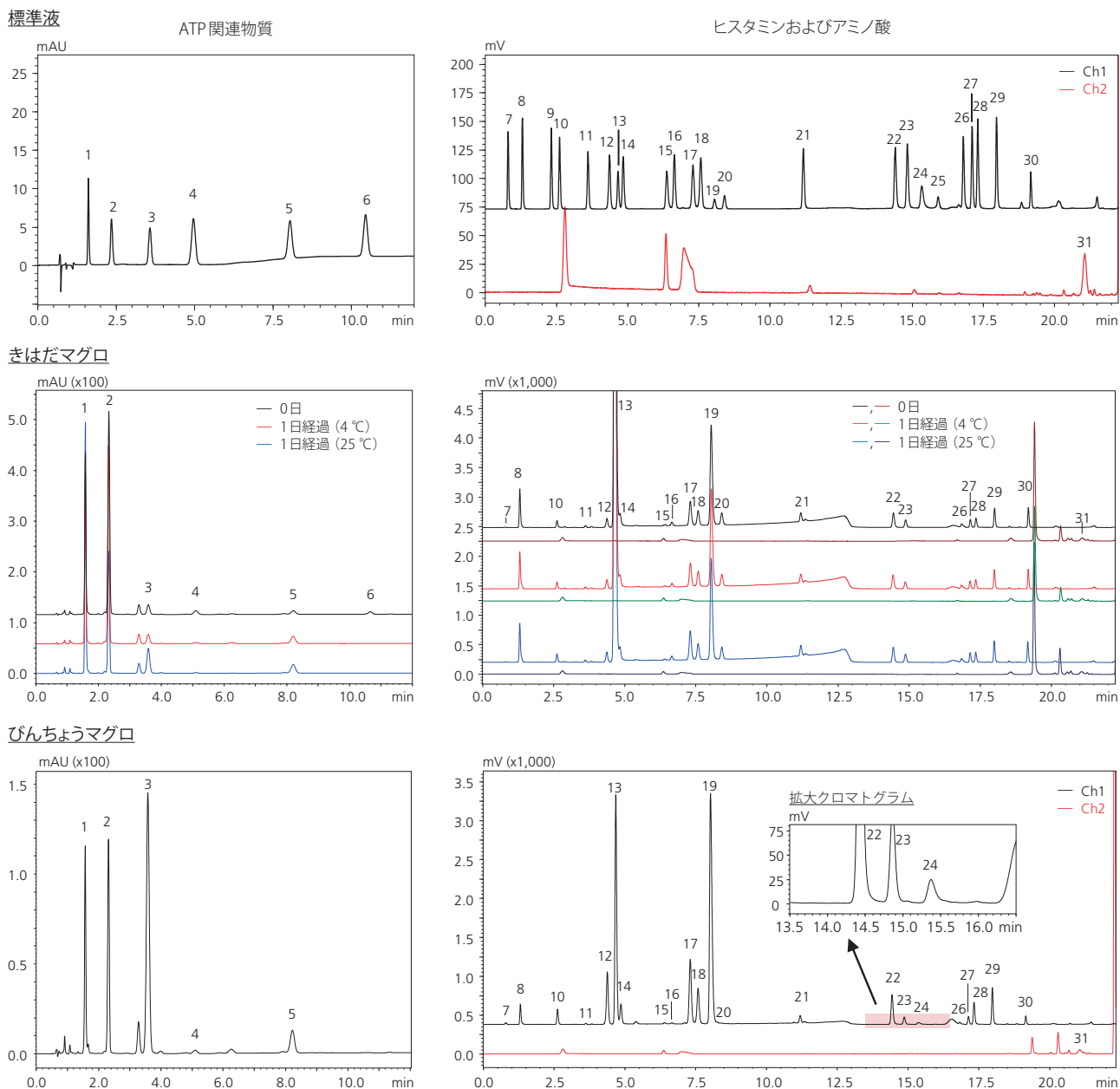


図4 標準液およびマグロ(きはだ、びんちょう)のクロマトグラム(ピーク番号:表1参照)

表8 きはだマグロ中の核酸、アミノ酸の定量値

ピーク番号・成分	きはだマグロ(0日) (μmol/L)*
2 IMP	278.9
8 Glu	46.6
13 His	(2416.0)
17 Ala	55.7
18 Tau	27.8
19 Ans	(1062.5)
20 Car	82.0
22 Val	23.6
29 Leu	20.4
30 Lys	50.7

* ()は定量範囲外の値

7. まとめ

Nexeraデュアルインジェクションシステムを用いて、マグロの鮮度測定とヒスタミンによる腐敗状態の測定を行いました。ATP関連物質とヒスタミンは、同じ前処理で抽出可能でした。すなわち、同じ前処理で得られたサンプルから分析可能です。

K値は保存日数、温度によって経時変化があり、高温であるほど鮮度が落ちることを示しました。また、K値で腐敗を示したサンプルにおいて、ヒスタミンも検出されました。さらに、ヒスタミンはアミノ酸と分離検出でき、魚肉に含有されるアミノ酸も同時分析が可能でした。

Nexeraデュアルインジェクションシステムを用いて、鮮度や腐敗状態を同時分析することで迅速に結果を得られ、魚肉試料の状態を多角的に評価できました。

Products

セミ分取 超臨界流体クロマトグラフ Nexera UC Prep

LCビジネスユニット
松本 恵子

分取超臨界流体クロマトグラフ (SFC) は分取精製装置の一つとして用いられますが、回収率・純度の改善、分取操作の簡便化など、解決すべき課題があります。

“Nexera UC Prep” は、分析用超臨界流体抽出/クロマトグラフシステム “Nexera UC” の優れた基盤技術と独創的な新技術との融合で誕生したセミ分取超臨界流体クロマトグラフシステムです。設置環境を選ばないコンパクトなシステムでありながら、高回収率分取精製と優れた操作性を両立しました。ここでは、Nexera UC Prepの分取精製業務効率化を推進する機能と代表的なシステムをご紹介します。



1. 時間当たりの分取量を最大化

超臨界流体クロマトグラフを用いる分取精製は、目的化合物を高濃度に濃縮し有機溶媒で回収するため、分析時間だけでなく、分取後の後処理時間まで時間短縮が期待できます。Nexera UC Prep では、さらに待ち時間を低減する連続分取や高い回収率での分取が可能であり、時間当たりの分取量を最大化します。

● SFCによる分析時間の短縮

SFCは超臨界CO₂が低粘性と高い拡散性を有するため、高流量であってもカラム負荷圧は低く、かつカラム効率を損なうことなく分析の高速化が可能です。HPLCに比べて分析時間の大幅な短縮が期待できます。

図1に、オメブラゾールのキラル分離における、分取LCと分取SFCの分析時間を比較した例を示します。分取SFCでは分取LCに比べて分析時間が4分の1に短縮されていることがわかります。

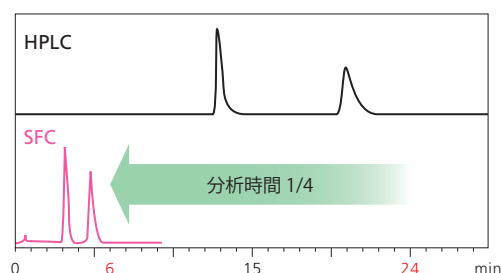


図1 HPLCとSFCの比較例 (オメブラゾールのキラル分離)

● 待ち時間なく連続分取：スタックインジェクション機能

キラル化合物の異性体の分離などピークの本数が限られている分析においては、スタックインジェクションにより分取精製の効率を向上させることが可能となります。通常のインジェクションによる分取では、ピーク溶出から次のピーク溶出までの間に無駄な時間が発生します。スタックインジェクション機能を用いることで待ち時間なく連続注入できるため、ピークが溶出していない時間を極力減らして、処理量を増やすことができます。

図2に、医薬品のキラル分離においてスタックインジェクションを活用した例を紹介いたします。スタックインジェクションを活用することにより、10.5分の分析時間内に通常インジェクションでは3回であった注入を9回まで増やすことができ、分取効率が3倍向上することができます。

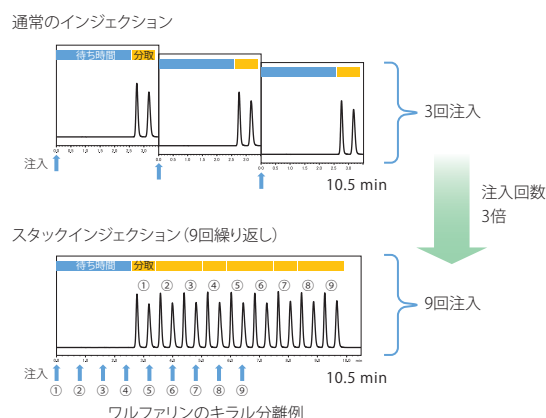


図2 スタックインジェクションの活用例 (医薬品のキラル分離)

また、スタックインジェクションは、ワークステーションLabSolutionsで簡単に設定できます。注入間隔、注入回数、待ち時間を設定し、シングル分析の結果(クロマトグラム)を使って、注入間隔に応じたシミュレーションを行うことで、実施前にピーク重複有無を簡単に確認できます。図3に、LabSolutionsによるスタックインジェクションのシミュレーション例を示します。

スタック注入(S)
 注入間隔(D): 0.80 min
 注入回数(N): 9
 次の前処理までの待機時間(W): 5 sec

スタックインジェクションの設定(下図のケース)

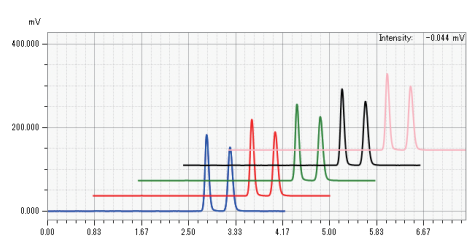


図3 スタックインジェクションのシミュレーション

2. 卓越した回収率で貴重な試料のロスを防止

SFCを用いた分取時では、CO₂が超臨界状態から約500倍の体積の気体状態に膨張する際のカラム溶出液の飛散が、回収率の低下やコンタミネーションの一因となっていました。

独創的な気液分離技術であるLotusStreamセパレーター(特許取得済み)はサンプルの飛散を起こすことなく液体を真下に滴下するため、良好な回収率でフラクションを回収し、さらに隣接する試験管へのコンタミネーションも抑制でき高純度での分取を可能にします。また、簡単に取り外して超音波洗浄ができ、「洗浄したい」というご要望も満たします。LotusStreamセパレーターの詳細につきましては、本誌「TEC」をご覧ください。

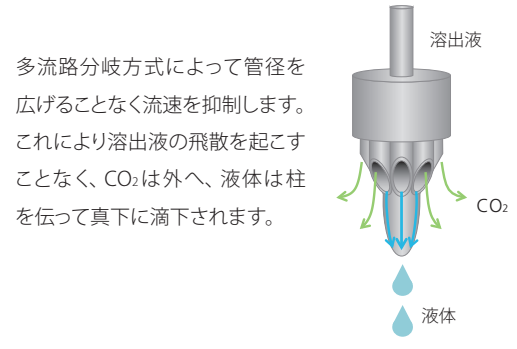


図4 LotusStreamセパレーター

さらに、香料のリナロールなど揮発性の高い化合物であっても、流量やモディファイア濃度に依らず、良好な回収率が得られます。

表1 1%リナロールの回収率

方式	回収率(%)
従来方式	78.0
LotusStreamセパレーター	96.7

3. コンパクトなベンチトップシステム

高流量のCO₂を送液するためには送液ポンプのポンプヘッド冷却が必要です。Nexera UC Prepはコンプレッサー型の小型冷却ユニットを採用し、床置きチラー不要のコンパクトなシステムを実現しました。分析スケールのSFCと同等の卓上スペースに設置が可能です。数百mg～数gオーダーの分取量に応じて、10～150 mL/minの幅広い流量範囲に1台で対応できます。図5に、Nexera UC Prepと他社同等システムのサイズ比較例を示します。

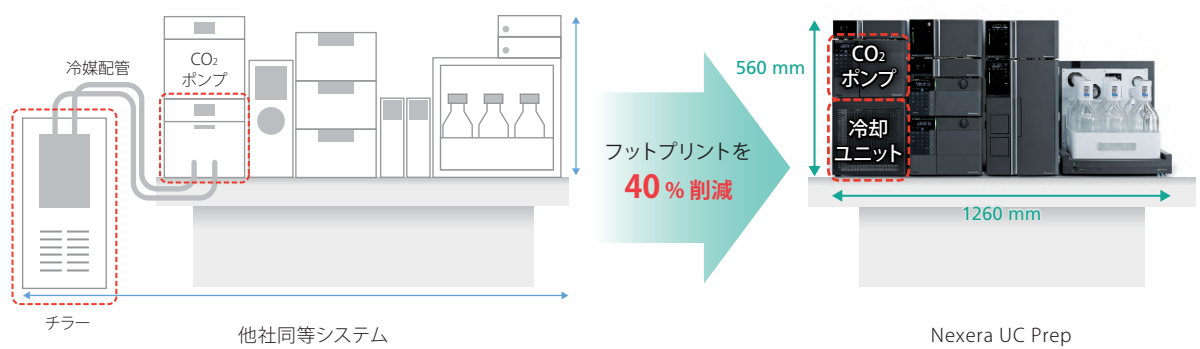


図5 サイズ比較例

4. 用途別に最適化されたシステム

● スタックフラクションシステム

数成分程度の化合物を繰り返し注入して大量分取することに特化したシステムです。インジェクターとフラクションコレクターの機能を併せもつ注入回収ユニット FRS-40は、1つのサンプルの繰り返し注入と、グラムオーダーでの分取を担いま

す。最大で20 mL*まで注入することができ、10本の回収を行うことができます。10～150 mL/minの流量に対応し、10～30 mm内径のカラムの接続が可能です。

*オプション



● マルチフラクションシステム

医薬品の不純物など多数のピークが検出されるサンプル中の各成分を分取する用途に適したシステムです。注入はオートサンプラーで行い、最大2 mL*まで注入でき、162サンプル(1.5 mLバイアル使用時)をセットできます。フラクションコレ

クター FRC-40 SFは、540本(10 mLバイアル使用時)までの分画を可能にします。10～150 mL/minの流量に対応し、10～30 mm内径のカラムの接続が可能です。

*オプション



● 分析フラクションシステム

合成確認などの目的で数mg程度の分画量で十分な場合に、分析スケールでの分取を実現するシステムです。Nexera UCにフラクションコレクター FRC-40 SFを接続して、分析から分取までシームレスに行えます。流量は最大5 mL/minで、

分析サイズのカラムの使用が可能です。島津独自のLotusStreamセパレーターにより、飛散を起こすことなく1.5 mLバイアルのような少量容器へも分取が可能です。



TEC

セミ分取超臨界流体クロマトグラフ用 LotusStream セパレーター

LCビジネスユニット

細井 千尋、田中 克博、松本 恵子、舟田 康裕

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) による分取は、分取 LC と異なり回収時に気体 CO₂ と液体を適切に分離しないと液体が飛散し、回収率の低下を招くという課題がありました。

ここでは、セミ分取超臨界流体クロマトグラフシステム

“Nexera UC Prep” 用に新規開発された気液セパレーター “LotusStream セパレーター” の気液分離技術を解説し、回収率の確認を行った事例をご紹介します。

1. LotusStream セパレーターの気液分離技術

SFC を用いた分取では、CO₂ が超臨界状態から気体状態になる際に、約 500 倍の体積膨張に起因するカラムからの溶出液の飛散が回収率の低下の一因となっていました。新規開発の気液分離技術 “LotusStream セパレーター” (特許取得済) は、多流路分岐方式によって管径を広げることなく流速を抑制します。これにより溶出液の飛散を起こすことなく、CO₂ は外へ、液体は柱を伝って真下に滴下されます。

図 1 に、LotusStream セパレーターの使用時と未使用時の気液分離の様子を示します (送液条件は表 1 参照)。LotusStream セパレーターがない場合は膨張した CO₂ の影響で液体が飛散し、液体の適切な回収が困難です。一方、LotusStream セパレーターがある場合は、CO₂ と液体が適切に分離された状態で液体の回収が可能になります。

表 1 LotusStream セパレーターのテスト条件

モディファイヤ	: メタノール (濃度: 20%)
流量	: 100 mL/min

2. LotusStream セパレーターによる回収率向上

Nexera UC Prep スタックフラクションシステム (キラル分離などの大量分取用のシステム、本誌 9 頁参照) を用いての回収率の評価を行いました。フラクションコレクターとして、バルブ切換方式により各容器に回収を行う FRS-40 を使用します。図 2 に、その流路図を示します。

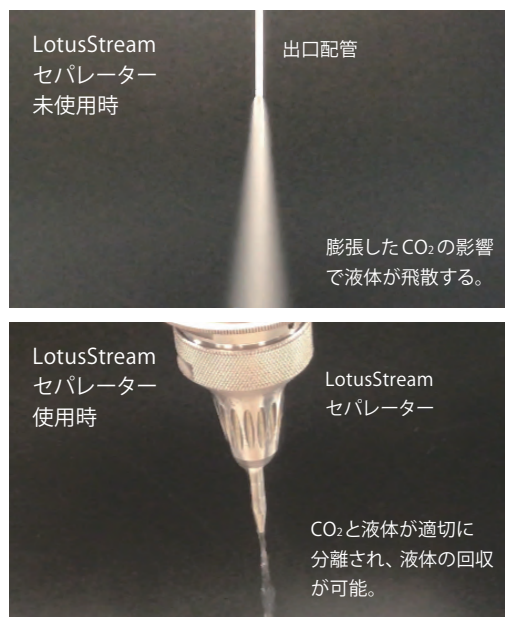


図 1 LotusStream セパレーター使用時・未使用時での気液分離の様子

回収時

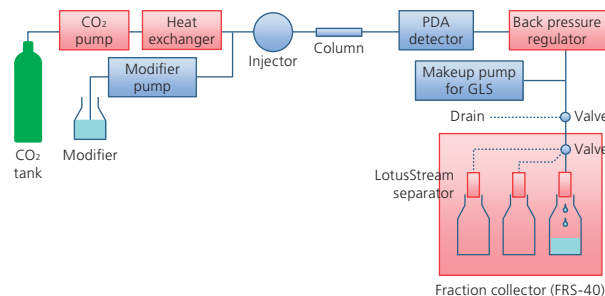


図 2 Nexera UC Prep スタックフラクションシステムの流路図 (回収時)

試料にはカフェイン (10 mg/mL)、揮発性化合物としてリナロール (1%)、低溶解性化合物としてヒドロコルチゾン (10 mg/mL) を使用しました。図3に、評価手順の概略を、またその詳細を以下に示します。

- ① SFC条件 (表2参照) により試料溶液を1 mL 注入し、ピーク溶出区間を回収容器に回収する (①)。注入は3回繰り返し、1つの容器に合わせて回収する。
 - ② 回収液を100 mLメスフラスコに移す (②)。回収容器はメタノールを用いて3回程度洗浄を行い、その洗浄液もメスフラスコに移す。その後100 mLにメスアップする。
 - ③ メスアップ後の回収液をSFC条件により1 mL再注入し、ピーク面積を確認する (③)。①～③を3回繰り返してn=3とする。
 - ④ リファレンスとしてLC条件 (表3参照) に設定し、フローインジェクションにより試料溶液を1 mL注入して回収する (④)。注入は3回繰り返し、1つの容器にまとめて回収する。
 - ⑤ 回収液を②と同様の手順で100 mLにメスアップする (⑤)。
 - ⑥ メスアップ後の回収液1 mLをSFC条件により再注入し、ピーク面積を確認する (⑥)。
 - ⑦ 以下の式に従って回収率を算出する。
- 回収率 (%) =
- ③で得られたピーク面積 ÷ ⑥で得られたピーク面積 × 100

表4に、回収率の確認結果を示します。物性の異なる化合物3成分全てにおいて、安定して良好な結果が得られることを確認しました。

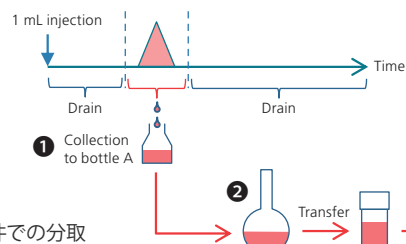
表2 分析条件 (SFC条件)

カラム	: シリカカラム (250 mm x 20 mm I.D.)
モディファイヤ	: メタノール (濃度: 10%)
流量	: 125 mL/min
メイクアップ	: メタノール
メイクアップ流量	: 10 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 1000 µL (ループサイズ: 2000 µL)
検出	: 272 nm (カフェイン) 205 nm (リナロール) 238 nm (ヒドロコルチゾン)
BPR 圧力	: 10 MPa
BPR 温度	: 50 °C

表3 分析条件 (LC条件)

カラム	: なし (フローインジェクション)
モディファイヤ	: メタノール (濃度: 100%)
流量	: 20 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量、検出	: 表2と同じ

SFC条件での分取



LC条件での分取 (リファレンス)

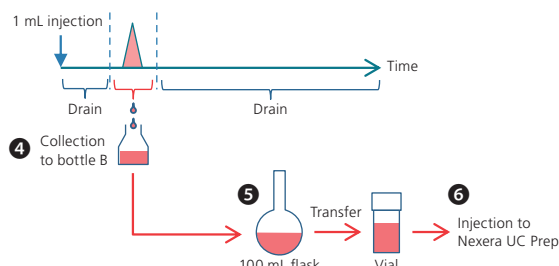


図3 回収率評価手順の概略

表4 回収率算出結果

化合物	面積 (LC) (リファレンス)	面積 (SFC) (平均値 (n=3))	SFC 回収率 (平均値)	回収率 %RSD
カフェイン	309936	301907	97.4%	0.46%
リナロール	207554	205183	98.9%	0.55%
ヒドロコルチゾン	334839	323088	96.5%	0.32%

分析超臨界流体クロマトグラフシステム Nexera UC にフラクションコレクター FRC-40 SF を追加すれば、少量分取も可能です。図4に、1.5 mL バイアルへ分取時の様子を示します。LotusStream セパレーターにより、飛散を起こすことなく少量容器への分取が可能です。



図4 分取時の様子

3. まとめ

- 島津独自の気液分離技術“LotusStream セパレーター”により、溶出液の飛散を起こすことなく CO₂ と液体が適切に分離され液体の回収が可能となります。
- LotusStream セパレーターを使用することで、物性の異なる化合物でも安定して良好な結果が得られます。
- フラクションコレクターを追加することで少量分取も可能となり、1台で条件検討から分取までを行うことができ分析業務効率の向上に貢献します。