

Technical Report

SFCを用いた脂質成分の分析条件設定と精密分取への展開 ～ジグリセリド異性体を事例として～

Development of analysis conditions for lipid components using SFC and development for precision preparative

大貫 隆史¹、唐川 幸聖¹、松本 恵子²、中山 聡¹

Abstract:

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は、高い拡散係数をもつ超臨界CO₂中で化合物とカラムが複雑な相互作用を示すことから、比較的疎水性の高い成分に対して特有の分離パターンを得ることができます。また、超臨界CO₂は、分取時に速やかに気化し分画容量を大きく低減できるという特長も有しています。このため、SFCでは精密分離と効率的な分取を同時に行うことが可能です。本レポートでは、SFCを多数の構造異性体が存在する脂質分析に応用した例を紹介し、モデル化合物として、ジグリセリドの1,2および1,3異性体を選択し、分析条件の設定とさらに同条件で精密分取を行う際の条件設定の注意点をまとめました。リポミクス研究などでの活用が期待されます。

Keywords: 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)、精密分取、分取SFC、FRC-40SF、脂質、ジグリセリド、キャリアオーバー

1. 背景

SFCは、疎水性から親水性化合物まで幅広い化合物の分析が可能な分析系と言われています。中でも疎水性成分を対象にしたアプリケーションがこれまでに多く報告されています。そこで、まず食品中の疎水性成分の代表例として脂質、特に多数の類縁体や異性体を持つグリセリドの測定を目指しました。GCやLCと比べSFCであれば、誘導体化なしに簡便に、構造異性体を含む一斉分離が可能です。

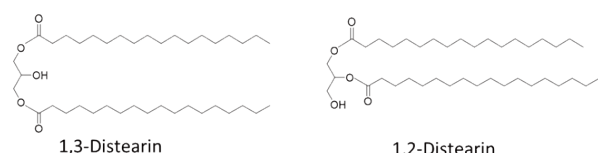
2. ジグリセリドの異性体について

グリセリドの構造には、トリグリセリド (TG)、ジグリセリド (DG)、モノグリセリド (MG) があります。

DGは、グリセロールに脂肪酸が2つ結合した化合物です。グリセロールには3つの脂肪酸結合部位がありますので、DGには1,3-DGと1,2-DGという2つの異性体が存在します。

本報ではDistearin (C18:0/18:0) とDiolein (C18:1/18:1) を例に異性体の分離を検討しました。DGの構造式をFig. 1に示します。

Distearin (C18:0/18:0)



Diolein (C18:1/18:1)

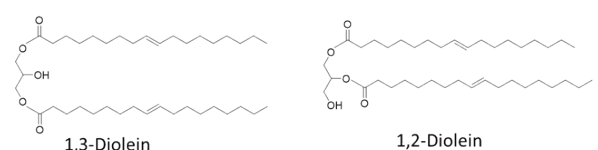


Fig. 1 DGの構造式

3. 装置構成

使用した装置の構成図をFig. 2に示します。

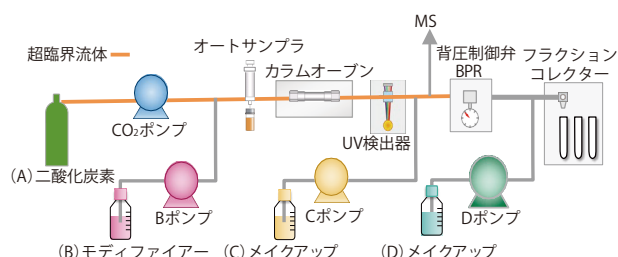


Fig. 2 装置構成図

4. 分析条件の設定

SFCは、DGのような比較的疎水性の高い成分の分析で威力を発揮します。誘導体化なしに、HPLCよりも分離度よく異性体分析が可能です。種々のカラムを評価した結果、順相系カラムのShim-pack™ UC-Diolが最も良好な分離を示し、各DGの異性体が分離することを確認しました。分析条件をTable 1に、得られたクロマトグラムをFig. 3に示しました。Diolカラムが良好な分離を示した理由は、DGのグリセロール部が持つOH基とカラム基材のシラノールとの相互作用によるものと考えられます。異性体の溶出順は、1,3-DGのOH基が疎水性の脂肪酸に挟まれた第二位にあり、第三位にOH基を持つ1,2-DGに比べシラノールとの相互作用が弱いと推察します。また、DGの脂肪酸部分は、Diolと相互作用しDistearinとDioleinの分離に寄与したと考えられます。

¹ 味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所 評価・分析室 先端分析グループ
² 島津製作所 分析計測事業部

Table 1 分析条件

System	: Nexera™ UC
Column	: Shim-pack UC-Diol (250 mm L.x4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A) CO ₂ B) Modifier: 0.1% Ammonium formate / Methanol
Make up	: C) 0.1% Ammonium formate / Methanol solution D) -
Modifier conc.	: 5%
Flow rate	: 2.0 mL/min C) 0.5 mL/min D) -
Column temp.	: 40 °C
BPR temp.	: 50 °C
BPR pressure	: 10.0 MPa
Detection	: LCMS-8040 (ESI, Positive mode, m/z 603.3, 607.3)

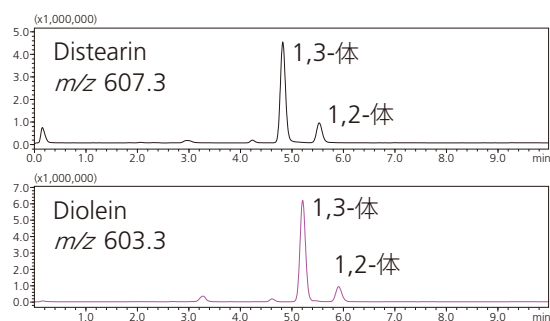


Fig. 3 DistearinとDiolein異性体のマスククロマトグラム

5. キャリーオーバーの対策

少し話が逸れますが、疎水性化合物は、装置内に残留しやすくキャリーオーバーが発生することがあります。定量分析においてキャリーオーバーにより正確な定量値が得られなくなることがあり、分析システムとして使用する際に大きな課題です。精密分取の場合は、キャリーオーバーにより対象外の成分が混入することがあり深刻です。そこで、キャリーオーバー対策を検討しました。

ここでは高圧バルブのロータシールに残留した成分の対策を示します。以下に示すプログラムは、ロータをLoadポジション(v.load)とInjポジション(v.inj)に繰り返し切替え、ロータシールに付着した成分を洗い流す目的で設定しました。LabSolutions™の「装置パラメータ」-「オートサンプラ」-「前処理プログラム」を開き、前処理プログラムモードにして、Fig. 4に示すプログラムを追加しました。

標準のプログラム	▼バイアルに移動
	▼サンプル吸引
追加したプログラム	▼サンプルを導入
	▼注入に使用する流路の洗浄
	▼「10分待機」
	▼「注入バルブ位置：Load」
追加したプログラム	▼「注入バルブ位置：Injection」
	▼「30秒待機」
	▼「注入バルブ位置：Load」
追加したプログラム	▼「注入バルブ位置：Injection」
	▼「30秒待機」
	▼注入に使用する流路の洗浄
分析終了	

Fig. 4 前処理プログラム

また、洗浄効果を高めるために測定成分がすべて溶出した注入から10分後にModifier割合を2 min維持するGradientプログラムを追加 (Table 2) し、この2 min間にロータシールの切替洗浄を行いました。これにより、キャリーオーバーを低減することができました (Fig. 5)。ここでの注意点は、前処理プログラムに設定した「30秒待機」のように「注入バルブ位置Injection」と「注入バルブ位置Load」の間に待機時間を設けることです。詳しい説明は割愛しますが、流路内の圧力を維持する時間をできるだけ長く確保することで、次の分析に支障を生じません。

Table 2 前処理プログラムの実行タイミング

Gradientプログラム [B.Conc.]

0-5%(10 min) ← 追加した Gradientプログラム
5%(2 min) ← ロータシールの切替洗浄を実行
 5-40%(0.01 min)
 40%(3 min)

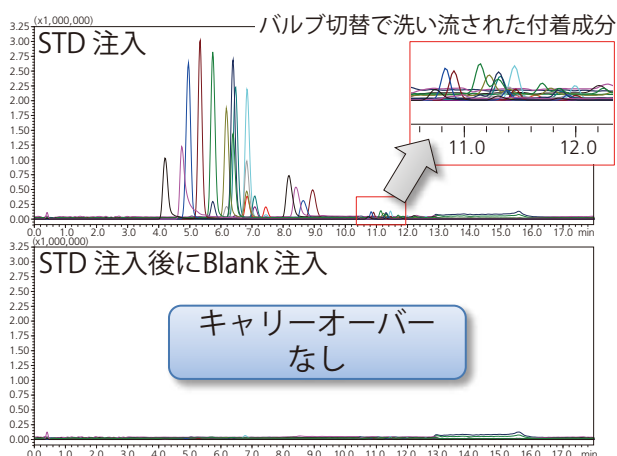


Fig. 5 キャリーオーバー対策の効果を示すマスククロマトグラム

6. 精密分取のための条件設定方法

キャリーオーバーの対策が整ったところで、分取の検討に入りました。今回はモデル実験ですが、実際には未知成分を分取し精密質量やNMRで構造を決めることもあると思います。分取を行う場合はCO₂が気化してしまうため、Make up CやMake up Dを導入する必要があります。まず初めにModifierで用いたMethanolをMake up C液として分取したところ、各画分に異性体が相互に混入するという課題が明らかになりました。分取条件をTable 3、DistearinとDioleinを分取した画分のマスククロマトグラムをFig. 6, 7に示しました。

このように、分析条件のまま分取を行うと、相互混入により精密分取できないことがあります。SFCは、BPR以降に流体の超臨界CO₂が気化します。そのため、分取する成分はModifierやMake up液で完全に溶解させる必要があります。今回ターゲットにしたDGは、比較的疎水性が高いため、ModifierおよびMake up液に用いたMethanolに溶解し難かったと考えられます。NMRを用いて構造解析するには純度95%以上にする必要がありますので、相互混入を少なくするためにMake up液の溶媒検討が重要です。

Table 3 分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol (250 mm L.x4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A) CO ₂ B) Modifier: 0.1% Ammonium formate / Methanol
Make up	: C) Methanol D) -
Modifier conc.	: 5%
Flow rate	: 2.0 mL/min C) 1.5 mL/min D) -
Column temp.	: 40 °C
BPR temp.	: 50 °C
BPR pressure	: 10.0 MPa
Detection	: UV210 nm

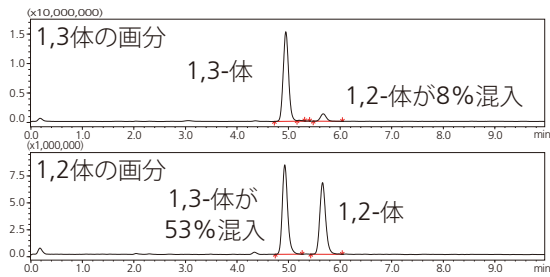


Fig. 6 Distearin 異性体各画分のマスクロマトグラム

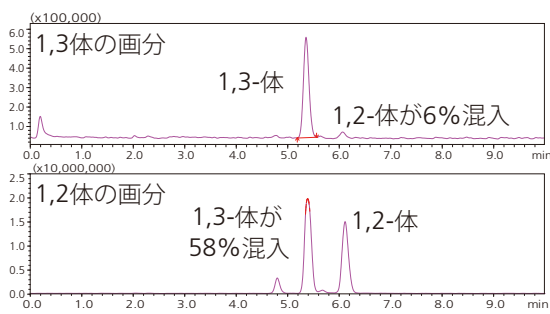


Fig. 7 Diolein 異性体各画分のマスクロマトグラム

6-1. 相互混入の原因

ここで相互混入の原因をもう少し詳しく考察します。

原因の1つ目は、前述したDGの溶解不足です。これは、Make up液をMethanolよりDGを溶解する溶媒へ変更することで改善が見込めます。

原因の2つ目は、共溶出です。この現象を検証するため、DGが溶出する前後の画分を調べることにしました。Diolein異性体分取箇所のイメージをFig. 8、マスクロマトグラムをFig. 9に示しました。まず、1,2-体は画分5の時間に溶出しますが、1,3-体が溶出する画分2に混入していました。もし、1,2-体が配管内に残留しているのであれば、画分1や画分3にも混入しますが、いずれにも検出されませんでした。

続いて1,3-体は、画分2の時間に溶出しますが、他の画分にも検出されました。配管内に残留した1,3-体が混入したと考えられます。その場合、画分3～画分5にかけて1,3-体のピークは小さくなるはずですが、画分5で大きく検出しました。つまり、1,2-体が溶出する画分5で混入量が増加しました。

この結果から異性体が溶出するタイミングにもう一方の異性体が選択的に混入していることがわかりました。そこで、我々の立てた仮説は、配管に残留(付着)したDGが、DGによって洗われて溶出する共溶出という現象です。イメージをFig. 10に示しました。想定される汚染部位は、SUSに比べ疎水性化合物を吸着するとと思われる(Dポンプ後の)六方バルブフラクションコレクター間のフッ素樹脂製配管です。

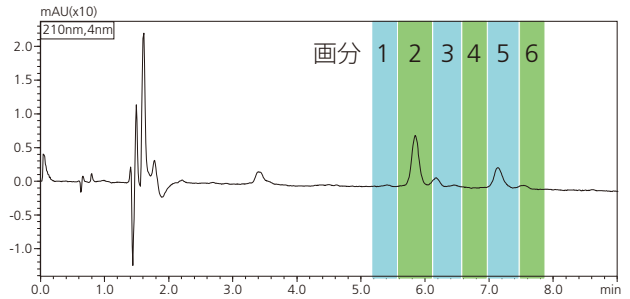


Fig. 8 Diolein 異性体分取箇所のイメージ

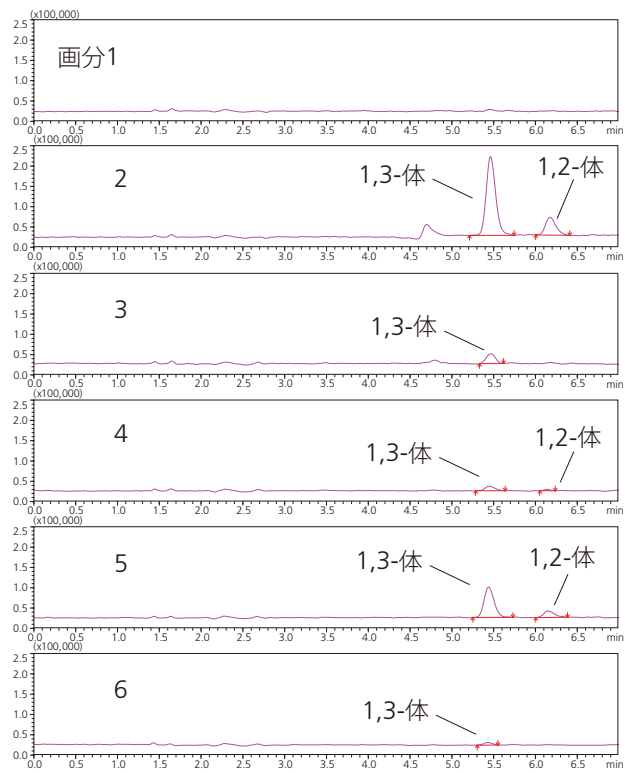


Fig. 9 Diolein 異性体画分のマスクロマトグラム

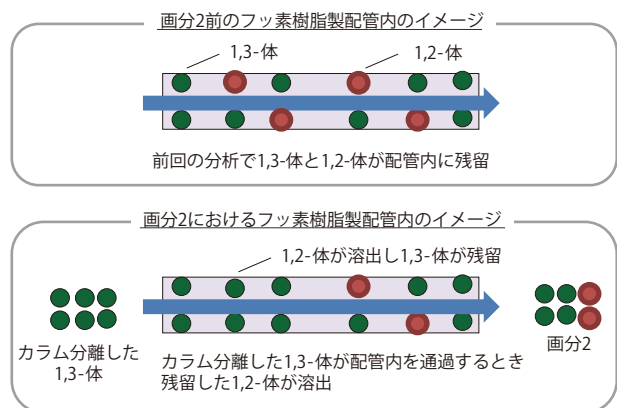


Fig. 10 共溶出のイメージ

6-2. Make up Cの検討

一つ目の原因を検証するため、Make up Cをより溶解力の高いHexane / Acetone (2:1)へ変更しました。分取条件をTable 4に、得られたマスクロマトグラムをFig. 11, 12に示しました。Make up液を試料溶媒と同じHexane / Acetone (2:1)に変更することで異性体の相互混入が大きく低減しました。

Table 4 分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol (250 mm L.x4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A) CO ₂ B) Modifier: 0.1% Ammonium formate / Methanol
Make up	: C) Hexane / Acetone (2:1) D) -
Modifier conc.	: 5%
Flow rate	: 2.0 mL/min C) 2.5 mL/min D) -
Column temp.	: 40 °C
BPR temp.	: 50 °C
BPR pressure	: 10.0 MPa
Detection	: UV210 nm

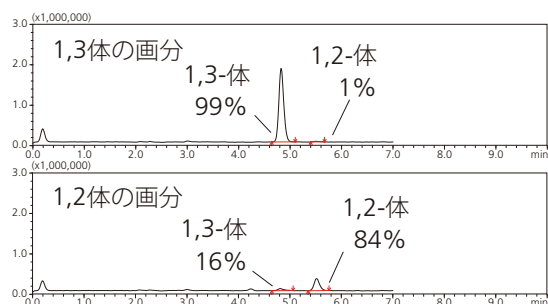


Fig. 11 Distearin異性体画分のマスクロマトグラム

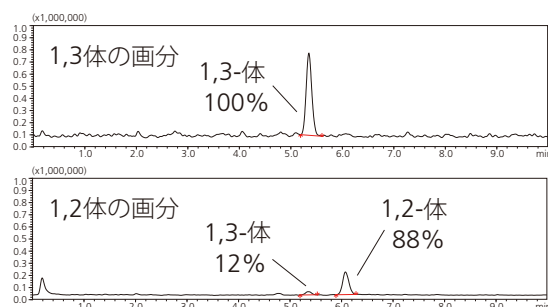


Fig. 12 Diolein異性体画分のマスクロマトグラム

6-3. Make up Dの検討

続いて、二つ目の原因を検証しました。DGをフッ素樹脂製配管に付着させないため、Make up Dを試料溶媒より溶解力の強いChloroformに変更しました。分取条件をTable 5に、マスクロマトグラムをFig. 13, 14に示しました。その結果、各画分への相互混入がなくなり、DG異性体を高純度で分取する条件を確立することができました。なお、Make up CはChloroformでも同様の効果が期待できますが、Make up Dは、Hexane / Acetone (2:1)では洗浄力が弱く、Chloroformで高い洗浄力が得られました。

Table 5 分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol (250 mm L.x4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A) CO ₂ B) Modifier: Hexane / Acetone (2:1)
Make up	: C) Hexane / Acetone (2:1) D) Chloroform
Modifier conc.	: 5%
Flow rate	: 2.0 mL/min C) 0.5 mL/min D) 2.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
BPR temp.	: 50 °C
BPR pressure	: 10.0 MPa
Detection	: UV210 nm

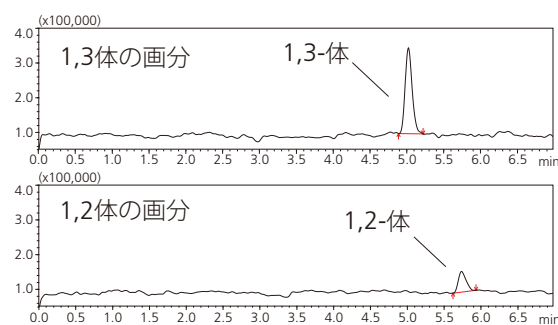


Fig. 13 Distearin異性体画分のマスクロマトグラム

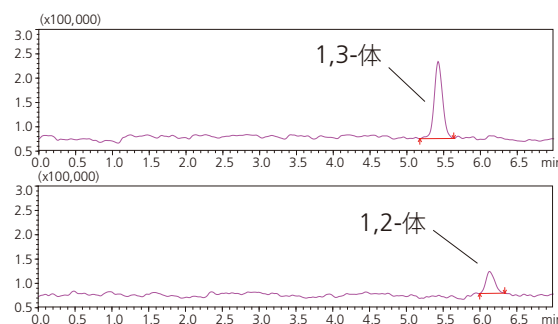


Fig. 14 Diolein異性体画分のマスクロマトグラム

7. 結論

SFCを用いてジグリセリド異性体を分析および分取する条件を確立しました。分析条件および精密分取条件の設定において、2か所でキャリアオーバーが発生することが分かりました。

1か所目は、オートサンプラーの高圧バルブロータシール。2か所目は、CO₂が気化するBPR後の流路です。これらのキャリアオーバーは、前処理プログラムの工夫と、最適なMake up液を送液することにより低減できました。

今回はSFCならではの事例となります。こうした事例を皆様と共有することでSFCが多くの分野で有効活用されることに期待したいと思います。

謝辞

九州大学 生体防御医学研究所 馬場 健史 教授、和泉 自泰 准教授にご助言いただきました。

Shim-pack, Nexera, LCMS および LabSolutions は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。

初版発行：2022年3月
© Shimadzu Corporation, 2022

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>