

超臨界流体抽出分離技術を用いた脂溶性ビタミン類プロファイリングシステムの開発

九州大学生体防御医学研究所 馬場 健史

脂溶性ビタミンは生体内の代謝機能を調節する役割があり、欠乏だけでなく過剰摂取も有害であることから生体内濃度を測定することは重要である。しかし、脂溶性ビタミン類は血清中の濃度が低く、光や酸素に敏感な化合物であることから、その正確な測定は容易ではない。

従来の脂溶性ビタミン類の分析では、抽出法として、液体抽出や固相抽出が、分析法として、液体クロマトグラフィー法、固相免疫検定法が主に用いられてきた。しかし、精度、再現性、網羅性等の点において課題があり、新たな分析法の開発が望まれている。

そこで、我々のグループでは、超臨界流体を抽出媒体として用いる、超臨界抽出 (supercritical fluid extraction; SFE) と、同じく超臨界流体を移動相として用いる超臨界流体クロマトグラフィー (supercritical fluid chromatography; SFC) に注目し、新規脂溶性ビタミン類の一斉分析系の構築に取り組んだ。さらに、当該研究では、これらの SFE, SFC をオンラインで接続することによって抽出、分析を連続して行い、質量分析計により高感度検出を行う脂溶性ビタミン類一斉プロファイリングシステムすなわち、オンライン SFE-SFC/MS 分析系の構築に取り組んだ。オンライン SFE-SFC/MS では光や酸素のない条件での抽出、分析が可能なることから、抽出、分析操作の際の分析対象化合物の変性を最小限に抑えることができる。また、抽出と分離分析をオンライン化することで、自動化によるスループット向上だけでなく、抽出成分を全量分析に導入できることから、少量サンプルの高感度分析が可能になる。

まず、新規のオンライン SFE-SFC 装置を開発した。続いて、SFE によって抽出された脂溶性ビタミン類をカラム先端で高効率に濃縮するためにカラムスクリーニングを実施し、脂溶性ビタミン類において保持の強いカラム担体を見出した。その後、超臨界流体による脂溶性ビタミン類分析に最適なカラムを用いてピーク形状、再現性がより高くなる SFE-SFC 条件を探索した。温度、圧力、モディファイアー濃度、グラジエント条件といった種々の条件を最適化することで、7 種類の脂溶性ビタミン類の定量が可能な実用的な多検体分析オンライン SFE-SFC/MS/MS システムの開発に成功した。抽出成分の全量導入が可能であることから、感度が向上し、本システムの検出限界は 216 fmol 以下であった。最終的に、最適化した条件を用いて実際にヒト血清内の脂溶性ビタミン類を定量し、従来の抽出、分析法と比較し、当該分析手法の有用性を評価した。最適化した条件でヒト血清を分析したところ、5 μ L の血清から 7 種類の脂溶性ビタミン類の定量

に成功した (図 1). 従来法と比較したところ, 本システムはより酸化の影響を受けない正確な分析が可能であることが示された.

本研究では, オンライン SFE-SFC/MS/MS における多様な成分の一斉分析システムの構築を目的とし, 脂溶性ビタミン類を用いて網羅的, 迅速かつ正確なプロファイリング手法の構築を行った. 構築したシステムには抽出成分を全量導入することが可能であり, 全自動かつ暗黒無酸素条件下で抽出から分析までを行うことができるため, 高感度により正確で精度の良い分析を行うことが可能であった. 本オンライン SFE-SFC/MS/MS システムはサンプルを前処理なしで抽出, 分析することが可能なシステムである. 本研究ではヒト血清を用いて脂溶性ビタミン類の定量を行ったが, 食品の酸化進行度のモニタリングや血中内で食事による変動が比較的小さいと考えられる酸化体の正確な分析に, 力を発揮すると考えられる.

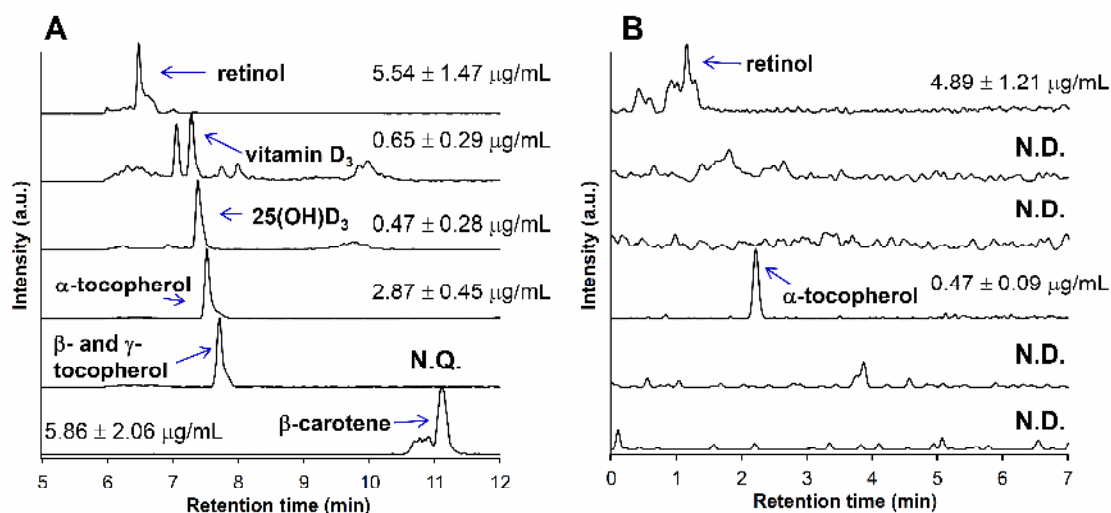


図 1 オンライン SFE-SFC/MS による脂溶性ビタミンの一斉分析

A: Online SFE-SFC/MS analysis, B: Hexane extraction and SFC/MS analysis

謝辞

本研究の遂行にあたりご支援を頂きました一般財団法人杉山産業化学研究所および関係者の皆様に深く御礼申し上げます.