

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：31311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07721

研究課題名(和文) 低温分離条件を活用した2次元HPLCシステムの構築

研究課題名(英文) Development of 2D-HPLC system by using low column temperature conditions and its application

研究代表者

赤坂 和昭 (Akasaka, Kazuaki)

尚絅学院大学・総合人間科学系・教授

研究者番号：10201881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：逆相HPLC法を用いたビタミンEの同族体8種の一斉分析法を確立した。この方法により20分以内にビタミンE同族体を分離・定量することができた。また、一部の試料でトコトリエノール類の分析の障害になったピークの影響を、2D-HPLC法を適用することにより取り除くことができた。

また、低温分離HPLC法を天然物の立体異性体組成分析に応用した。その結果、*gammaproteobacterium Microbulbifer* sp. から単離された、新規アルカノイルイミダゾール化合物の分岐不斉の立体構造の解析を行い、S体が主ではあるが、R体も9%程度含まれることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPLC法の新しい分離モードとして、カラム効率の低下による分析時間に長時間を要するなどの欠点のため用いられなかった低温分離条件を用いたHPLC法の提案により、既存のモードでは分離が困難であった化合物の分離実現の可能性を開くことができた。また、低温分離条件を用いた2D-HPLCシステムの構築により、夾雑成分を多く含む試料中の極微量成分を精密分析することや、効率的分離精製を行う上で特に有効なツールとなることを実証することができた。さらに、オンライン濃縮法は、不安定な化合物を濃縮する上で特に有効であると期待できた。

研究成果の概要(英文)：Simultaneous determination method of eight homologues of vitamin E was established by using reversed-phase HPLC under low column temperature conditions. By this method, vitamin E homologues could be separated and quantified within 20 minutes. In addition, the influence of the peaks that interfered the analysis of tocotrienols in some samples could be eliminated by the 2D-HPLC using low column temperature separation system.

On the other hand, the low temperature separation HPLC method was also applied to the stereoisomer composition analysis of a novel alkanoylimidazole compound isolated from *gammaproteobacterium Microbulbifer* sp. which has an anteiso branched methyl group. As the results, the stereochemistry of the anteiso branched methyl was found that the S-form was the main stereoisomer (about 91%) but about 9% of the R-form was also contained.

研究分野：分析化学

キーワード：低温分離 逆相HPLC ビタミンE 光学活性天然物 組成分析 二次元HPLC法

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

HPLC 分離において、低温下での分離では、ピークのブローディングによるカラム効率の低下やカラム圧の上昇により分析に長時間を要するなどの欠点があり、これまでほとんど用いられてこなかった。しかし、遠隔位不斉識別能の発現には、 $-30\sim-70^{\circ}\text{C}$ 程度の低温条件下での分離が必須であった。これは、揺らぎの大きなアルキル鎖の動きを抑え分子の形状を固定化する効果がその一因と考えられた。その一方、伊原らは、高分子充填カラムが相転移温度以下で規則的な液晶状態となると、立体識別能が急激に向上すると報告しており、低温条件下における逆相カラム固定相の相転移による液晶構造形成による分離特性の変化の寄与も大きいのではないかと考えられ、室温条件と低温条件では同じカラムでも分離特性が大きく変化するものと期待できた。

しかし、これまで、低温条件下における分離挙動については、ほとんど検討がなされておらず、様々な化合物について保持特性を明らかとする必要がある。また、低温条件の利用においては上述の通り、カラム効率の低下やカラム圧の上昇などの欠点もあることなど、克服すべき課題もある。本研究は、これらの課題の克服により、新しい分離モードとしての「低温クロマトグラフィー」の提案と二次元 HPLC (2D-HPLC) システム構築への展開を目的とするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低温分離条件を活用することにより、① 低温分離条件下における各種化合物の保持・分離特性について、分離カラム、移動相溶媒の影響を明らかとし、低温分離の欠点であるカラム効率の低下の克服を図り、低温分離条件を用いた分析への応用を行う。② 常温 HPLC 法により分離した標的化合物をオンラインでトラップ・濃縮する方法の基本条件を設定するとともに、精製・濃縮効率および濃縮・脱離によるピーク形状への影響などについて、モデル化合物として検討を行う。さらに③ 常温分離と低温分離を組み合わせた 2D-HPLC システムの構築により、試料を損失することなく天然物中の微量成分の分析において妨害となる夾雑成分の効率的な除去と精密分析を実現する。更に、オンライントラップ・濃縮機能を活用し、第 1 のカラムで数回分離を繰り返し、目的画分のみを低温にした第 2 カラムで濃縮したのち、分離・精製することにより、超微量成分の高感度検出、または分取・精製するシステムを確立し、2D-HPLC 法による精密分析・分取システムの構築と実用性評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低温分離の特性評価

本研究における予備的検討として、冷却システムの改良、および低温分離条件下における分離特性に与える因子について検討した。まず、カラム冷却システムについて、安定的な低温環境の保持とカラム交換の簡便性を両立したシステムの構築について検討した。

更に、低温分離条件下における分離カラムによる分離特性への影響について、光学活性な 13-メチルペンタデカン酸の不斉誘導体を試料として、その光学活性化合物の分離特性により評価した。逆相カラム固定相のアルキル鎖長の影響 (ODS カラムと C30 カラム)、カラム充填剤の粒子径 ($5\mu\text{m}$ と $3\mu\text{m}$) の分離に与える影響について検討した。また、ODS カラムについてはコアシェル型カラムについても検討した。

(2) トコトリエノール及びトコフェロールの逆相 HPLC 法による一斉分析法の確立

ビタミン E の 8 種の同族体である α -、 β -、 γ -、 δ -トコトリエノール (T3) および α -、 β -、 γ -、 δ -トコフェロール (Toc) の逆相 HPLC による同時分析法の確立を目的に、逆相カラム固定相のアルキル鎖長の影響 (ODS カラムと C30 カラム)、および各同族体の保持挙動に与えるカラム温度の影響、およびカラム温度と移動相流速が与える理論段への影響について検討した。

さらに、8種の同族体の完全分離が達成できた条件を用い、ビタミンE同族体の定量性評価(定量範囲、繰り返し精度、検出下限、添加回収率)、ならびに食品試料分析への応用として試料の食用植物油8種、および粉末状試料6種について分析を行った。

また、こめ油などでは共存する成分がT3類の正確な分析の障害となったことから、二つの異なる分離系をオンラインで連結する2D-HPLC法について検討した。

さらに、C30カラムを用い分離したトコフェロールを、オンカラムで濃縮する方法について検討した。カラムとしてDevelosil C30-UG-3(4.6×150mm)を用い0°Cで分離したβ-トコフェロールの画分を、モノリス型カラムで-50°Cでトラップし、回収率により評価した。

(3) 低温分離条件を用いたアンテイソ型分岐不斉を有する天然有機化合物の立体異性体組成分析への展開

抗菌性、細胞毒性のある新規アルカノイルイミダゾールのBulbimidazole Aのアルキル鎖中のアンテイソ型分岐不斉構造について、その絶対配置と立体異性体組成分析を行った。Bulbimidazoles A-Cは、五十嵐らにより単離・構造決定された化合物である。イミダゾール環からアンテイソ型側鎖を切り出し、アンテイソ型脂肪酸である8-メチルデカン酸としたのち、蛍光不斉誘導体化試薬で誘導体に導き、ODSカラムを用い、-42.5°Cで分離し、298nmで励起した際の460nmの蛍光強度を計測した。立体が既知の出発物より化学合成した標準物質の誘導体との保持時間の比較から絶対配置と異性体組成分析を行った。

4. 研究成果

(1) 低温分離の特性評価

カラムの冷却を安定的に行うための冷却槽を自作した(Fig.1)。その結果、400~600rpmで-60°C以下の低温でも安定的な攪拌が可能で、離れた位置に挿入した2つの温度センサーの値はほぼ一致し(±0.2°C以内)、攪拌効率が十分であることが確認できた。投げ込み冷却装置は、温度コントローラーで制御され、冷媒の温度の変動は、±0.6°C程度の範囲であった。

この冷却装置を用い、カラムを冷却して、低温分離条件における分離特性の評価を行った。その結果、光学活性13-メチルペンタデカン酸の不斉誘導体の分離は、室温付近では全く達成できなかったが、カラム温度の低下に伴い分離係数 α が向上し、-30°C以下でピーク分離が可能となった。一方、温度低下に伴いカラム効率も低下したが、低流速にすることで改善が可能であった。THFの混合溶媒系でのメタノールとアセトニトリルの比較では、後者がカラム効率で、前者が分離係数でそれぞれわずかながら優れていることが認められ、使い分けが有効と考えられた。また、-40°Cにおける固定相粒子径の影響について、Develosil ODS-HG-3を用い検討した結果、5 μ mより3 μ mを用いた場合の方が、理論段数が2.4倍程度高く、カラム効率が大きく向上し、小粒子径の充填剤の有効性が強く認められた。一方、コアシェル型カラムでは、分離にかかわる有効表面積が小さいため、低温分離に対しては十分な効果が得られなかった。

(2) トコトリエノール及びトコフェロールの逆相HPLC法による一斉分析法の確立

ビタミンE(VE)は、 α -、 β -、 γ -、および δ -トコトリエノール(T3)と α -、 β -、 γ -、および δ -トコフェロール(Toc)の8種の同族体からなる脂溶性のビタミンで、その分析は、主に順相系のカラムを用いて行われている。¹⁻³⁾ これは、逆相系の方が分析コストや安全性、汎用性の面で優れているものの、ODSカラムでは、 β -と γ -Tocおよび β -と γ -T3の分離が困難な

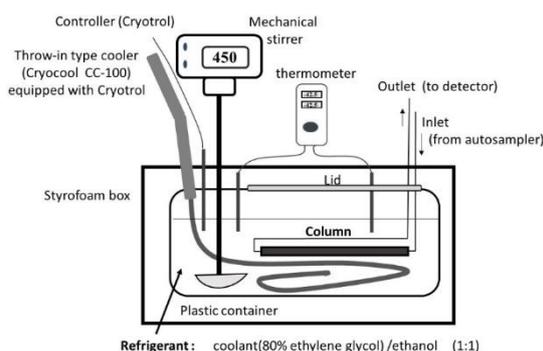


Fig.1 Column cooling system

めである。そこで、逆相 HPLC 法によりビタミン E 同族体の一斉分離・分析法の実現を目指し、低温分離の適応の可能性について検討した。その結果、Develosil C30-UG-3(4.6 x 150 mm)を用い、100%メタノールで溶出した場合、カラム温度の低下とともに分離の困難であったピークの実分離が実現し、 -4°C 、 0.9 mL min^{-1} の条件で、8種の同族体を順相系とほぼ同等の20分で完全分離することができた (Fig. 2)。低温分離によるカラム効率の低下は流速の抑制と粒子径の小さな充填剤を用いることにより改善することができた。また、カラムを氷水 (0°C) で冷却するだけでも、 0.6 mL min^{-1} で溶出することにより25分以内での完全分離が達成でき、より簡便な分析システムとして汎用性が高いと考えられる。

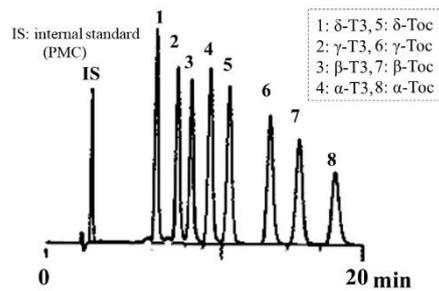


Fig.2 Typical HPLC separation of T3s and Tocs on a Develosil C30 UG-3 column

Column: Develosil C30 UG-3 (4.6 mm x150 mm),
Mobile phase: methanol, Flow rate: 0.9 mL min^{-1} , Column
Temperature: at -4°C , Detection: fluorometry (ex. 297 nm, em. 325 nm)

設定した条件で分析を行った際の各 VE 同族体の定量性、ピーク面積の繰り返し精度、および検出限界について検討した結果、検量線は導入量で $10^{-10}\sim 10^{-7}\text{ g}$ オーダーの広範囲にわたり良好な直線性を示し、検出限界 (S/N=3) は $10\sim 55\text{ pg}$ で、実用性の点で十分な感度であった。また、ピーク面積の繰り返し精度も $0.6\sim 3.5\%$ で良好であった。

ケン化を行わずにヤシ油を分析した際の添加回収率は $93\sim 97\%$ と非常に高く、大過剰に共存するトリアシルグリセロールの影響を全く受けることはなかった。また、米ぬかをケン化・抽出・濃縮の一連の操作を行った際の添加回収率は $78.3\sim 80.5\%$ であった。ケン化の操作が加わったことにより、ピーク面積のばらつきがヤシ油に比べて大きく、また添加回収率も下がったが、実用範囲内であると判断できた。

分析した植物油 8 種、粉末状試料 6 種の中で、こめ油など一部の試料では共存する成分が T3 類の正確な分析の障害となった。そこで、2D-HPLC 法の適応について検討した (Fig. 3)。その結果、こめ油では、共存する成分によるピークと完全に分離し、その影響を受けることなく検出することができた。また、小麦胚芽では、保持時間からは判別が困難であった δ -T3 および α -T3 を明確なピークとして検出することができ、極微量な γ -T3 も検出することができた (Fig. 4)。

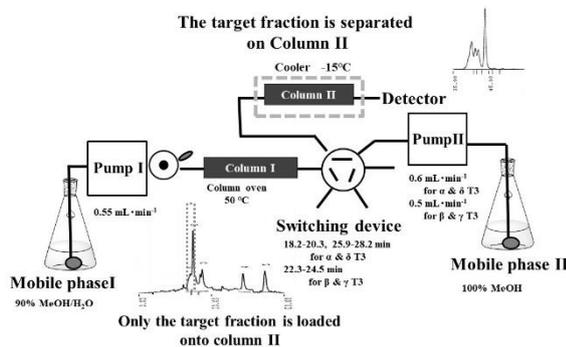


Fig. 3 2D-HPL System for analysis of T3s

Column I : Chromolith Performance RP-18e (4.6 x 100 mm) x 2
Column II : Develosil C30-UG-3 (4.6 x 150 mm)

逆相 HPLC 法を用い、これまで実現できなかった 8 種の VE 同族体の同時分析を、低温分離条件を適用することにより、これまでの順送 HPLC 法と同程度の分析時間および感度で実現することができた。また、比較的安価で、安全性の高いメタノールの単一溶媒系による分離・分析の実現により、回収した溶出液を簡単な蒸留等の処理により繰り返し移動相として利用することも可能で、コストの削減、及び実験環境の改善とともに、環境負荷

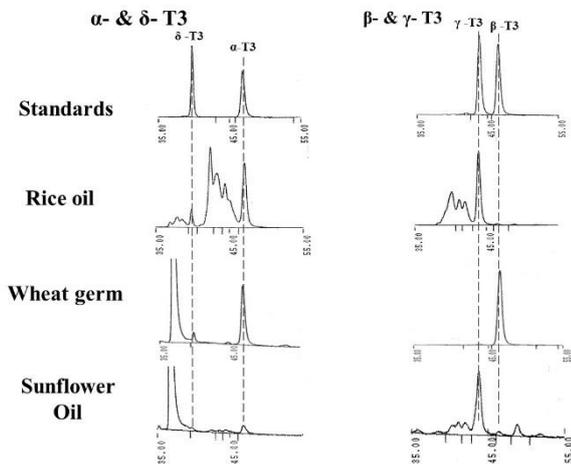


Fig.4 Typical chromatograms of T3s on 2D-HPLC system

の低減にも寄与するものと考えられる。また、従来法では共存する成分の影響について十分な検討はなされていなかったが、2D-HPLC 法への展開によりその影響を明らかとすることが可能となり、試料油として mg レベルの大量導入も可能であったことから、T3 の正確な分布を明らかとするうえで有効な方法といえる。また、共存する成分の生成過程などの研究にも応用が期待できる。

さらに、低温で非常に保持力が強くなる特性を生かし、酸化安定性が低いビタミン E を試料としたオンライン濃縮法について検討した。メタノールを用い 0°C で、C30 カラムを用いて分離した β -トコフェロール画分 (17.9-19.4 分) をカラムスイッチング法で -50°C に冷却したモノリス型の ODS カラムに導入した (移動相の体積として 0.9 mL)。この操作を 12 回繰り返し計 0.9 μ g の β -トコフェロールを ODS カラムに導入後、室温にカラムを戻してメタノールで溶出することにより β -Toc を回収した。その結果、ピーク面積から 91.8% の β -Toc を回収することができた (Fig. 5)。トラップされた試料はカラム中では極低温に保たれ、酸素への暴露も防ぐことができ、溶出は室温に戻すのみの操作で行えることなどから、不安定な化合物の分取に有効と期待できた。

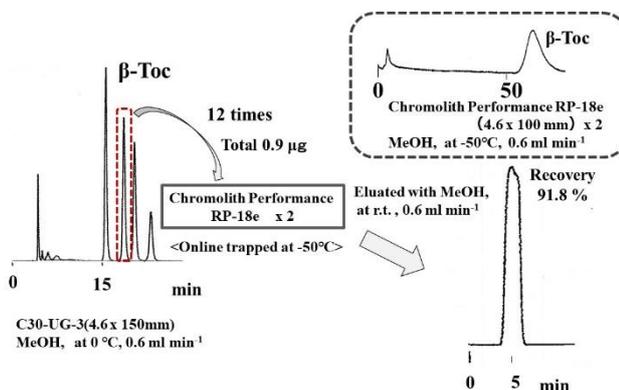


Fig.5 Online concentration of β -Toc

(3) 低温分離条件を用いたアンテイソ型分岐不斉を有する天然有機化合物の立体異性体組成分析への展開

抗菌性、細胞毒性のある新規アルカノイルイミダゾールの Bulbimidazole A (Fig. 6) のアルキル鎖中のアンテイソ型分岐不斉構造について、その絶対配置と異性体組成分析を行った。8-メチルデカン酸を蛍光誘導体に導いた後、分離の最適条件の検討を行った結果、Develosil ODS-HG-3 カラムを -42.5°C に冷却し 0.075 mL/min の低流速で溶出することにより (S)-8-メチルデカン酸を (R)-及び (S)-2A1P-OH でそれぞれ誘導体に導いた化合物を分離することができた。

Bulbimidazoles A のアンテイソ分岐鎖の立体化学は 8S 体が主であるが 9% 程度の 8R 体を含んでいることを明らかとした。このような、アンテイソ型の分岐不斉において、光学異性体の混合物であった例は 2 例目⁴⁾で、低温分離条件を用いた本法は、新しい知見を得るための有効な方法と言える。

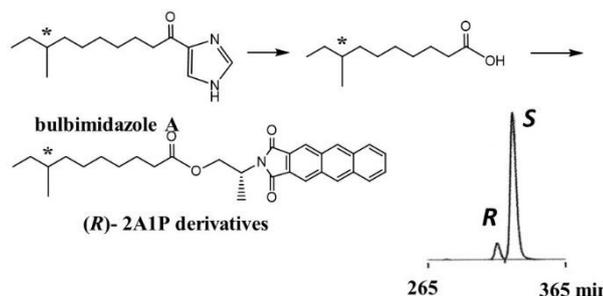


Fig. 6 Preparation & HPLC chromatogram of 2A1P derivatives from bulbimidazole A

引用文献

- 1) P. Sookwong, K. Nakagawa, Y. Yamaguchi, T. Miyazawa, S. Kato, F. Kimura and T. Miyazawa, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 3350-3355 (2010)
- 2) S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, and M. Beatriz P. P. Oliveira, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3351-3356 (2006).
- 3) 日本薬学会: 衛生試験法・注解 2005、金原出版、p.218-220 (2005)
- 4) Youngju Kim, Hiromu Ogura, Kazuaki Akasaka, Tsutomu Oikawa, Nobuyasu Matsuura, Chiaki Imada, Hisato Yasuda, Yasuhiro Igarashi, *Mar. Drugs.*, **14**, 4110-4125 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 赤坂和昭	4. 巻 79
2. 論文標題 逆相HPLC法によりトコトリエノール類及びトコフェロール類の一斉分析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 尚絅学院大学紀要	6. 最初と最後の頁 69-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Md. Rokon Ul Karim, Enjuro Harunari, Naoya Oku, Kazuaki Akasaka, and Yasuhiro Igarashi,	4. 巻 83 (4)
2. 論文標題 Bulbimidazoles A-C, Antimicrobial and Cytotoxic Alkanoyl Imidazoles from a Marine Gammaproteobacterium Microbulbifer Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1295-1299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤坂和昭
2. 発表標題 低温分離条件を用いた逆相HPLCによるビタミンE類の分離・分析
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤坂 和昭
2. 発表標題 トコトリエノール及びトコフェロールの逆相HPLC法による一斉分析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----