

[連載講座]

クロマトグラフィーによるワイン 及びワイン成分の分析 (3)

山梨大学工学部化学生物工学科

鈴木 義 仁

小 泉 均

4. 超臨界クロマトグラフィー

=====

特徴

- ・ GC と HPLC の中間に位置するクロマトグラフィーである。
- ・ HPLC に比べて分離の迅速性及びカラム効率に優れている。
- ・ GC では分離不可能な揮発性あるいは熱的に不安定な化合物を低温で取り扱える。
- ・ 温度と圧力を制御することにより溶解能力を容易に変えられる。

=====

気体、液体、固体の3状態は体積が一定ならば圧力、温度によって定まる。二酸化炭素 CO_2 は臨界温度 31.3°C 以下ならば、圧力によって状態が決まる。また圧力 73 atm 以下の圧力では、温度によって3状態の存在を決めることができる。

この臨界温度と臨界圧力を越えた条件下では、任意の状態即ち超臨界状態と呼ばれる状態となる。超臨界クロマトグラフィー (SFC) は臨界流体状態の CO_2 をクロマトグラフィーの移動相溶媒に使用したクロマトグラフィーである。

4. 1. 装置

GC や HPLC の装置と本質的に異なるのは、移動相の排出口に可変抵抗をつけて、系内の圧力を調節して、臨界圧力以上の圧力に保つための圧力調整用の排出弁である。

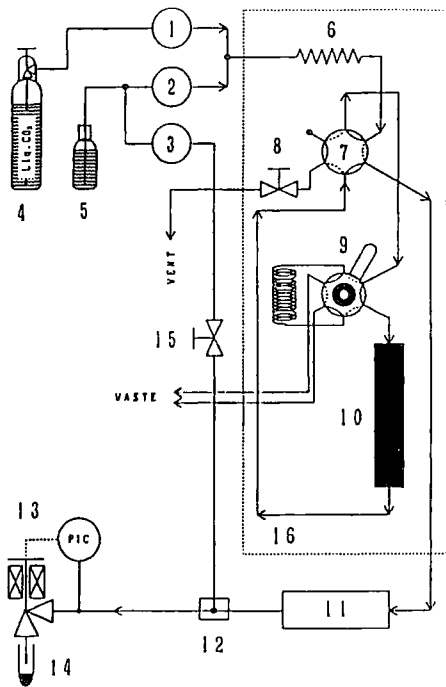
また、ポンプを冷却して、 CO_2 が液体状態を保つような温度で液体クロマトグラフィーのポンプを使用するように装置化されている。市販の装置の流路図を図1に示す。

CO_2 ボンベからの CO_2 は冷却され、液体状態でポンプより送液される。試料が注入され、カラム恒温槽で臨界温度以上の温度に保たれる。出口の圧力を調節して臨界圧力以上になると、カラム中は超臨界状態になる。試料は超臨界溶媒でクロマトグラフィーされる。

カラム出口に置かれた検出器で、分離された成分濃度を記録する。排出弁を経て大気圧

となった CO₂は気体状態に変化して、排出される。

カラムの代わりに抽出器を設置すると、超臨界状態の抽出 (SFE) が行える。



- 1 = CO₂ ポンプ; 2 = モディファイアポンプ;
- 3 = 溶媒ポンプ; 4 = CO₂ シリンダー;
- 5 = モディファイア溶媒; 6 = プレヒートコイル;
- 7 = 六方バルブ; 8 = ニードルバルブ;
- 9 = 注入口; 10 = カラム;
- 11 = フォトダイオードアレイ UV 検出器;
- 12 = T ジョイント; 13 = 背圧調整器;
- 14 = 捕集管; 15 = シャットオフバルブ;
- 16 = オープン

図 1 SFE/SFC装置略図

4. 2. 超臨界流体の物性

表 1 に超臨界流体、気体、液体の 3 状態の物性を示す。

表 1 超臨界流体、液体、気体の物性

| 性質 | 気体 | 超臨界流体 | 液体 |
|-----------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| 密度 (g/cm ³) | 10 ⁻³ | 0.3 | 1 |
| 拡散係数 (cm ² /sec) | 10 ⁻¹ | 10 ⁻³ | 5 x 10 ⁻⁶ |
| 粘性 (g/cm · sec) | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻³ | 10 ⁻² |

- ◆ 密度 : 物質の溶解に関与
- ◆ 拡散係数 : 物質の移動速度に関与
- ◆ 粘度 : カラム内の圧力に関与

超臨界状態にある流体の密度は気体より数百倍大きくて、液体に近い。密度が大きいと

試料の分子との相互作用が増大し溶解度が増加するので、GCで分析が困難な高沸点物質のクロマトグラフィーが可能となる。

粘度は気体状態に近く、拡散係数は液体より2桁大きい。拡散係数が高いと物質のカラム内の移動速度を増加でき、系内の分配平衡の速度が増加する。従って、分離能が向上し、移動相の速度を増加できる。このことは、HPLCよりも分析時間を短縮できることを意味する。

CO₂が超臨界流体として、もっぱら使用される理由は操作上で安全なばかりでなく、臨界圧力を越えた付近では圧力を少し変化させるだけで、流体の密度が著しく変化する。密度の変化はHPLCやGCでは選択できない、新しいクロマトグラフィー条件となり、分離の改善や分析時間の短縮が期待される。

一例として、私どもが行った結果を以下に記載する。これはASEV(1992, 11)に発表した概要である。

4. 3. ぶどう種子の超臨界抽出と超臨界クロマトグラフィー

超臨界流体溶媒を用いて天然物から有用な特定成分を分離する方法は、コーヒーの脱カフェインやホップのエッセンスの抽出に適用されている。一般に植物の種子中には脂質が多く含まれている。ブドウの種子中にも、熟度や品種により差はあるが、風乾物に対して10~20%の脂質が存在するといわれている。乾燥した種子を加熱圧搾した油の組成はリノール酸が約71%と多く、他にオレイン酸も含まれている。飽和脂肪酸は約15%存在するとの報告もある。

溶媒抽出に比べて迅速な抽出が可能な超臨界流体(CO₂)を用いて、ブドウ種子中の脂質を抽出した。抽出された脂質はケン化後、フェナシルエステル誘導体として超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)を行い、ブドウ種子中の脂質を構成する脂肪酸の同定および定量が行える。

実験には、日本分光SUPER-200超臨界流体抽出/クロマトグラフ装置を用いた。

【抽出】内容積1 mLのSFE容器に粉碎した0.50 gブドウ種子(甲州1990、マスカットベリーA1991)を入れ、CO₂ 5.0 mL/min、圧力290 kg/cm²、温度45°Cで脂質の超臨界流体抽出を行った。一方、この抽出物に含まれる脂質は1 M KOHメタノール溶液1 mLで加水分解した後、内標準(ペンタデカン酸 C15 8 mg/mL) 2 mLを加え、溶媒を減圧下で留去した。

【誘導体化】得られたカリウム塩は水1 mLに溶解した。フェノールフタレイン指示薬を一滴加え、塩酸で中和する。アセトニトリル(MeCN) 10 mLを加え塩酸で微酸性とした後、誘導体化試薬のp-ブromoフェナシルブロマイドと触媒としてジシクロヘキサノ-18-クラウン6-エーテルを含むMeCN溶液(10 mg, 1 mg/mL) 10 mLを加え、80°C、30分反応させた。

【SFCの分離条件】カラムに東京化成 KASEISORB LC ODS 300-5 (4.6 x 250 mm)、移動相はCO₂ 3.0 mL/min + MeOH 0.02 mL/min、温度45°C、圧力100-140 kg/cm² (8 min)の圧力プログラミング法を用いた。日本分光MULTI 330多波長検出器でクロマトグラムを測定した。

またそれぞれの脂肪酸の定量は内標準のピーク面積比から求めた。

【ブドウ種子中の脂質の抽出】粉碎したブドウ種子0.50 gを抽出容器に入れ、超臨界流

体 CO₂ (流量5.0mL/min、圧力290kg/cm²) 温度45°Cで SFE を行った。抽出は多波長検出器でモニターした。抽出プロファイルより 5分経過後で脂質全体の78%、10分経過後で92%が抽出され、15分で抽出はほとんど終了した。

【ブドウ種子中の脂肪酸の分析】SFE 抽出物をフェナシル誘導体として、SFCを行った。図2に、SFE 及び図3に溶媒抽出(メタノール/クロロホルム=1/10, V/V)で得られたクロマトグラムを示した。

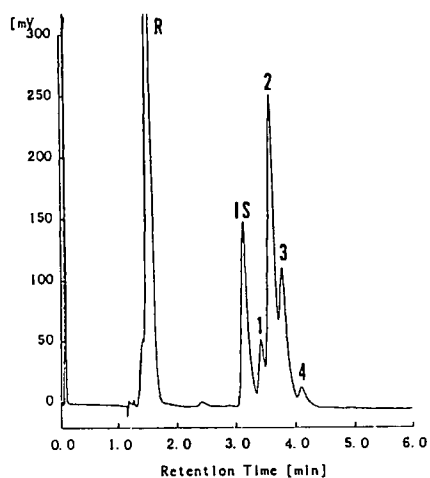


図2 SFE抽出物のクロマトグラム

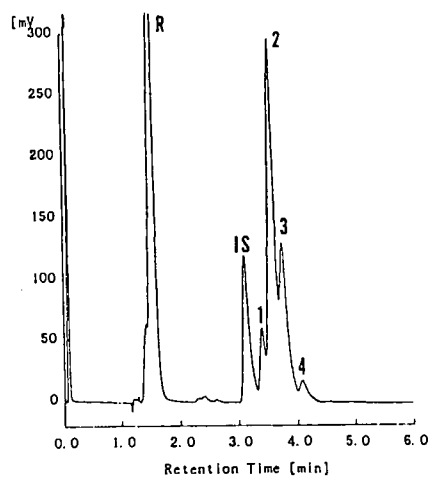


図3 溶媒抽出物のクロマトグラム

SFC条件 Column : Kaseisorb LC-ODS 300-5 (4.6 mm I. D. x 250 mm) ;
 Mobile phase : CO₂ + Me OH (3.0+0.02mL/min) ; Oven Temperature : 45°C ;
 Pressure : 100-140 kg/cm² (5 kg/cm²/min) ; Detector : UV 254 nm
 Peaks : R=Reagent ; IS=Pentadecanoic acid ; 1=Linolenic acid ;
 2=Linoleic acid ; 3=Oleic acid ; 4=Stearic acid

図2, 3はクロマトグラムがよく一致している。SFEでも構成脂肪酸の組成分析が可能であることを示唆している。

この例のように、微量な試料の脂肪酸組成が、簡便に、迅速に分析が可能であるため今後、各種の成分分析の有効な方法として、利用が拡大されるものと期待している。

5. 質問Qと回答A

講座の最終にあたり、具体的な事項について質問・回答形式でクロマトグラフィーの総括をいたします。

Q : 高速液体クロマトグラフィーの分析で注意する事は？

A : カラムの劣化と移動相の送りポンプ、検出器の選択である。

カラムの劣化は次のようなことに起因する。

注入試料に微粒子が入っているとカラムがつまり易い。試料を溶解した後や除タンパク処理を行った後は必ず、0.45 μ m程度のフィルターで口過しておく必要がある。またアルコールを含む移動相は微生物が繁殖しやすく、移動相が減少したときに移動相溶媒を補充することにより長期間使用していると、溶媒中に微生物が発生しカラムフィルターを詰まらせ、圧力が上昇することがあるため、毎日必要な量を作るとよい。

濃すぎる試料をカラムに注入すると、カラムを早く劣化させ、異常ピークの原因となるため、試料はできるだけ希釈してフィルターを通した後注入する必要がある。試料が濃すぎたり、溶解させる溶媒の溶媒強度が移動相に比べて強すぎると一部の試料がカラムの先端に吸着されたり、入口フィルターが詰まり、片流れの状態となり、カラムの分離性能を劣化させる原因となる。このような場合、メタノールのような極性の大きな溶媒で適宜カラムを洗浄する必要がある。

カラムの汚染防止には交換の容易なプレカラムの利用も有効な方法である。

ポリマー系充填カラムは圧力や溶媒により変形したり、膨潤や収縮を受け易いため、急激な圧力変動は避けるべきである。また最近の主流である化学結合型 ODS カラムは pH 特に塩基性移動相では数百時間しか安定に使用できないため注意が必要である。

移動相の送りポンプ

移動相の流量の精度はポンプ性能に依存するが、移動相に溶解した気体がプランジャーポンプヘッドに入ると送流量が減少し、保持時間が変化する。これを防ぐためには必ず移動相の脱気操作（アスピレーター+超音波）が必要である。しかし揮発性の高いメタノールを含む場合には、一定条件でこの操作を行わないと移動相組成が変化するため注意が必要である。また移動相流路の溶媒置換は溶媒の相互溶解性を調べてから実施しないと、混合したときに気泡が発生したり、完全に置換できない。高濃度の緩衝液を使用した場合には水で十分流路を洗浄しておかないと塩が析出し、プランジャーシールを傷つけてしまうので注意が必要である。更に移動相を口過して用いないとポンプヘッドのボール弁にごみが付着し、弁の開閉が不完全となり、流量が不安定となる。

検出器の選択

LCではGCにおける水素炎イオン化検出器（FID）のような高感度でほとんど全ての有機物に応答する検出器は存在しない。従って、分析する試料にあった検出器の選択が必要となります。一般的な検出器として RI 検出器と紫外検出器があります。RI 検出器はほとんど全ての有機物に応答しますが感度は中程度であり、勾配溶離には適用できません。一方、紫外検出器は紫外領域に吸収を示す化合物に適用でき、選択性もあります。また高感度かつ選択的な蛍光検出器も使用する事ができます。試料の誘導体化は反応による選択性を高めると同時に紫外や蛍光検出器への適用を拡張する方法となります。

Q：カラムの選定は困難でしょうか？

A：LCは固定相と移動相において物質の両相との相互作用の程度の差による移動速度の差を利用する分離方法です。おおまかな目安としてまず、分析しようとしている試料の分子量が2000以下かあるいは以上であるか、また水に可溶か否かを調べます。2000以上であれば、分子ふるいを用いる GPC（ゲルパーミエーションクロマトグラフィー）により水系または有機溶媒系で分離されます。2000以下ならばイオン性かどうかを調べ、イオン性ならば、カチオンかアニオンかによりそれぞれのイオン交換カラムを選択すればよいで

しょう。イオンでなければ、試料が無極性か極性物質かを調べ、分配系や吸着系カラムが選択されます。このように注目している試料の特性を見極めることが適切なカラムの選択の基準となります。

Q：クロマトグラムが分析の都度に変わる原因は？

A：いくつか原因が考えられます。保持時間の変化とピーク感度に分けて考えてみます。

分配クロマトグラフィーでは室温の変化により溶質の分配係数が増えるため、従って保持時間も変化してしまいます。HPLC 装置は温度変化の少ない場所に置く必要があります、特に RI 検出器を使用する時には感度も変わるため特に注意が必要です。(最新の RI 検出器は温度調節は十分可能です)

また移動相中の気泡により設定した流量が増えることやわずかな pH の違いで相互作用が増える化合物 (pH 変化に敏感なアミノ酸) では保持時間が変動し易い。特に脱気した移動相では徐々に炭酸ガスが再び溶け込み pH がわずかながら変化する事がありますので注意が必要です。

注入に使用するマイクロシリンジの中には以外と前の試料が残っています。溶媒でよく洗浄しておかないとゴーストピークが現れ、定量分析に支障をきたしたり、別の試料を採取する時にその試料を汚染してしまうので注意して下さい。マイクロシリンジは濃度が同じ場合でも少なくとも 5 回、濃度が異なる時には 10 回以上洗浄する事を薦めます。この際洗った液は当然別の廃液容器に捨てる事は言うまでもありません。試料の大量注入や不純物の吸着により、カラム入口フィルターが詰まるため、圧力が徐々に上昇し、その結果流量が小さくなったり、過負荷のため保持時間が変動することもあります。

紫外検出器を使用して短波長で測定すると、移動相の屈折率が変わり吸光度が増えるため徐々にベースラインが上昇することもあります。また検出器の光源の不安定さやセルの汚れもピーク感度に影響を及ぼします。

Q：有機酸を分析したいが、どんな方法が適当か？

A：脂肪族カルボン酸はエステル化してガスクロマトグラフィーで分析できるが、水酸基などを持つ有機酸は高速液体クロマトグラフィーが適当です。

高速液体クロマトグラフィーでは有機酸は色々な状態で分析される。移動相に強酸を加えて、解離を抑制すると分配系の分離条件で分析ができます。中性もしくは塩基性で分析すると、有機酸は解離形となるのでイオンクロマトグラフィーのモードで分析されます。また、有機酸を誘導体化すると逆相分配クロマトグラフィーが適用できます。【次項参照】

Q：有機酸の誘導体化法を教えてください。

A：GC と HPLC とについて答えます。

GC では遊離のカルボキシル基のままですと、沸点が高いため次のようなエステル化を行い、吸着を防ぎ、低温で分離を行うことができます。例えば有機酸を約 2 ml の 10% メタノールを含むエーテルに溶解した後、ジアゾメタンを用いてメチルエステル誘導体とする方法とビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミドやトリメチルシリルイミダゾールを用いてカルボキシル基をトリメチルシリル化する方法が一般に用いられます。後者の場合には乳酸の水酸基もエーテル化され、GC のカラム温度が低くても分離可能と

なります。ペンタフルオロベンジルブロマイドを誘導体化試薬に用いると電子捕獲検出器が使用でき選択的な検出が可能となります。

LCで一般によく使用される紫外検出法には、p-ブロモフェナシルブロマイドが用いられます。誘導体化の際クラウンエーテルを触媒に用いると容易にエステル誘導体とすることができます。微量の有機酸を高感度に分析する必要がある時には、4-ブロモ-7-メトキシクマリンを用いて蛍光性のエステル誘導体として分離・検出することができます。

Q：飲料食品中の陰イオンを調べたい。どんな方法でしょうか？

A：ワインなどの飲料には、有機酸やフェノール、糖類がかなり多く存在する。前処理なしではカラムが劣化する。セパックフィルターなどの前処理用のものが市販されている。これを通すと、フェノールなどが吸着除去される。試料注入器の先端にこれを取り付けて試料をろ過するような操作で、イオンクロマトグラフィーに試料を導入すれば良い。ハロゲンや硝酸イオン、硫酸イオン、燐酸イオン、などの無機陰イオンは迅速に分析される。また、有機酸などの陰イオンは分析条件を変更すると、同様に分析できる。無機陰イオンは葡萄などの産地に起因するといわれ、このような方法で陰イオンの分析が必要である。

Q：アミノ酸の分析について教えてください。

A：分離はクエン酸緩衝液を用いてイオン交換カラムで行います。アミノ酸と特異的に反応するニンヒドリン試薬を反応試薬として用います。反応生成物は可視光吸収物質となり、570nm及び440nmで感度良く検出できます。更に高感度に検出するには、一級アミンと特異的に反応するオルトフタルアルデヒド（OPA）を反応試薬に用い、得られる蛍光物質を励起波長340nm、蛍光波長460nmで測定します。これらの方法はいずれもポストカラム誘導体化法ですので反応液を送液するポンプが必要となります。カラムに注入する前に誘導体化を行えば、HPLC ポンプだけで分析することができます。例えば、アミノ酸はダブルクロライドとpH 9で誘導体化され、逆相系で分離後、可視440nmで検出することができます。

Q：ワイン中にも脂肪酸が存在するのでしょうか？

A：ワインをエーテルで抽出すると、脂肪族化合物がエーテル層に集められる。この抽出物はエーテルを留去したあと、水酸化ナトリウム溶液を加えて加水分解（鹼化）する。十分に鹼化したのち、エーテルと振り混ぜて、不鹼化物をエーテル中に溶解させ、エーテル相を除去する。水溶液部分には塩酸を加え、十分に酸性とする。カルボン酸を抽出してから、クロマトグラフィー分析する。GCではメチルエステル化してから、HPLCではフェナシルエステル化してからクロマトグラフィーを行う。【カルボン酸の項目】を参照。

Q：ワインの中の香りを分析したいのですが。

A：香りの成分は各種のものが考えられるが、揮発性の成分を把握する事が重要である。試料をフラスコ中に入れ、減圧として揮発成分を集め、ガスクロマトグラフィーで分析する。

クロマトグラフパターンとして比較すると、ピークが不明でも香りの善し悪しは研究で

きる。いわゆる、ヘッドスペース分析方法がこれである。クロマトグラフィーのみでなく、マススペクトル (MS) も可能となる。

化学反応を利用するとタイプ別の分析が出来る。たとえば、アルデヒド類は2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの溶液中にヘッドスペースのガスを流入させると、アルデヒドが存在すると沈澱が生成するので、これを有機溶媒層に転溶して高速液体クロマトグラフィーを行うとアルデヒドの種類が判明する。香りは微妙で、明確にクロマトグラフィーのみで判定するには困難さがある。

Q：ジュース中の糖類を分析したい。どんな方法があるのでしょうか？

A：単糖類を分析する場合について答えます。

比較的濃度の高い糖は、アミノカラムを用いて溶離液にアセトニトリル/水移動相により分離できます。検出器には示差屈折率計 (RI) が用いられます。またイオンクロマトグラフィーでは、糖はホウ酸と錯体を形成するため、アニオン交換カラムで分離できます。モノエタノールアミンと加熱すると蛍光物質を生成するので高感度検出も可能となります。水酸化ナトリウム溶離液を用いてパルスアンペロメトリー検出することもできます。還元糖にのみ適用できる方法として、蛍光試薬のダンシルヒドラジンと反応させ誘導体とした後、ODSカラムで分離後、蛍光検出も可能です。

Q：クロマトグラフ的なワインの色の分析は、考えられるのでしょうか？

A：赤ワインの色は主に、アントシアニンによるものである。吸着剤を詰めたカラム中をワインを流して、色素を吸着させたのち、エタノールで色素を溶離させる。逆相クロマトグラフィーでこの溶液を分析する。検出器にホトダイオード検出器を使うと、溶離する色素のスペクトルが得られる。標準のアントシアニンのスペクトルと比較すると色相の表示が得られると思います。

Q：水の分析はどのような方法がありますか？

A：水の分析方法については、JISなどの公定試験法が規定されております。ここでは、上水を対象として水中の微量イオンを分析する方法について答えます。溶存している陽イオンと陰イオンはイオンクロマトグラフィーを用いるのが適当です。本文に記載しましたように、サプレッサー付きの装置を用いると、高感度でイオンが検出されます。カラムは低交換容量のイオン交換剤を使用すると短時間で溶存イオンの ppb オーダーまで分析可能です。詳しくは、イオンクロマトグラフィー・データブック (科学新聞社、1991) p105~110を参照して下さい。

Q：アミンの分析方法を教えてください。

A：揮発性のアミンは容易にGCで分析可能です。溶液状態にあるときは、試料溶液を塩基性として加熱するとアミン類を発生させ、捕集できます。捕集物はこのあとGC分析をします。不揮発性のアミンや分解しやすいアミンは、HPLCが適当です。この場合には、本文に記載したように、誘導体化してからHPLCを行うと高感度に検出できます。ビールなどに存在する微量のアミンは蛍光誘導体化してHPLCで分析されます。以上。