

文 献

- 1) J. Hermansson, B. Wiese : *Chromatographia*, **14**, 529 (1981).
- 2) L. R. Gelber, J. L. Neumeyer, *J. Chromatogr.*, **257**, 317 (1983).

☆

Determination of D- and L-Dopas in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography with chiral mobile phase. Yukio Aso, Sumie YOSHIOKA, Toshio SHIBAZAKI and Mitsuru UCHIYAMA (National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158)

The high performance liquid chromatography using chiral mobile phase containing L-phenylalanine-copper (II) complex was evaluated for purity test and stability test of L-Dopa preparations. The influences of the complex concentration and methanol content in the mobile phase on the separation of D- and L-Dopas were studied. The complex concentration had little influence on the separation, while the decrease in methanol content increased the retention time and the resolution. The detection limits obtained with UV detector and electrochemical detector were compared, and it was found that electrochemical detector could detect much less D-Dopa in the presence of L-Dopa than UV detector. D- and L-Dopas in tablets were determined simultaneously by connecting a UV detector and an electrochemical detector in series.

(Received September 30, 1985)

Keyword phrases

determination of D- and L-Dopas in pharmaceutical preparations; high performance liquid chromatography using chiral mobile phase containing L-phenylalanine and copper(II) complex; detection with ultraviolet and electrochemical detectors.

超臨界流体抽出/超臨界流体クロマト ラグフィー直接導入法によるビタミン Kの分析

本堂敏信[®], 斎藤宗雄, 千田正昭*

(1985 年 9 月 30 日受理)

1 緒 言

超臨界流体がよく物を溶かすという性質は、既に約 100 年前から Hannay ら¹⁾により知られていたが、実用的な超臨界流体抽出 (Supercritical fluid extraction : SFE) の手法は、Zosel ら²⁾によってわずか 20 年ほど前に始められたにすぎない。その後、SFE は主として工業的規模の抽出の手法として発展したが、分析的な応用はほとんど報告がなかった。著者らは、分析規模での SFE を行い、その抽出物を直接、超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical fluid chromatography : SFC) 系に導入する新しい分析手法 (SFE/SFC) について既に報告した³⁾⁴⁾。又、その手法を用い、コーヒー中のカフェイン、レモン果皮中のフレーバー成分、小麦はい芽中のビタミン E、塩化ビニルシート中の可塑剤などの分析についても報告した^{4)~7)}。SFE/SFC の手法を用いると通常の溶媒には溶けにくいサンプルであっても固体あるいは粉末のまま分析できるため、単に SFE における抽出条件の検討にとどまらず、新しい分離分析手法として種々の応用が期待される。この手法は、複雑な前処理が必要な脂溶性成分、ペプチドなど通常の溶媒には溶けにくい成分の分画及び分析への応用が考えられる。しかし、超臨界流体は液体に比べて極めて圧縮性が高く、わずかな温度、圧力変化により密度が大幅に変わり、従って溶媒強度が大きく変化するため、従来の高速液体クロマトグラフ装置を流用したシステムでは、SFE、SFC いずれの分析手法としても十分な再現性を得ることが困難であった。今回、著者らは SFE/SFC 専用機として新たに開発された日本分光 SUPER-100 型 SFE/SFC システムを用いて、脂溶性ビタミンの一種であるビタミン K の分析を試みた。その結果、SFE 抽出物を直接 SFC に導入した場合においても良好な再現性が得られた。

* 日本分光工業株式会社 : 192 東京都八王子市石川町 2967-5

2 実 験

2.1 試 薬

ビタミンK₁, K₂ 標品は和光純薬工業製, ビタミンK₃ 標品は日清化学製のものをを用いた。

2.2 装 置

装置の詳細については、既に報告した³⁾⁴⁾ Fig. 1 に流路システムを示す。ポンプから供給されポンプ (2) により加圧された液化二酸化炭素は、抽出カートリッジ、インジェクター、必要に応じて分離カラムを通り、検出器、トラップカラム、バックプレッシャーレギュレーター、フローメーターを経て排出される。ポンプ (3) は抽出エントレーナーあるいは SFC におけるモディファイヤー溶媒を加圧送液する。抽出カートリッジ、分離カラム、インジェクターなどはオープンに収容され、抽出あるいはクロマトグラフィーに必要な温度に保たれる。

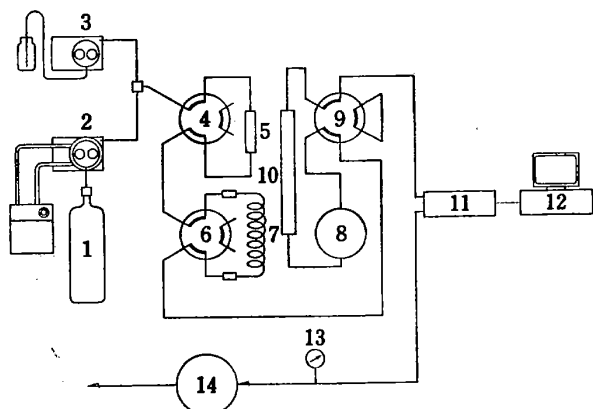


Fig. 1 Hydraulics of directly coupled supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography (SFE/SFC)

1 carbon dioxide cylinder; 2 pump for delivering liquefied carbon dioxide; 3 pump for delivering modifier solvent; 4 6-way valve; 5 extraction cartridge, thermostated in oven; 6 6-way valve; 7 extract trap loop; 8 6-way valve; 9 injector valve; 10 chromatographic separation column in oven; 11 multiwavelength UV detector; 12 data processor; 13 pressure gauge for monitoring back pressure; 14 pressure regulator

本装置に用いた日本分光 MULTI-320 型多波長紫外吸収検出器は、抽出物あるいは分離カラムからの溶出物の紫外吸収スペクトルをリアルタイムで CRT 上に表示することができる。

3 結果及び考察

Fig. 2 にビタミンK標品の SFE/SFC による三次元クロマトグラムを示す。エタノールに溶解したビタミンK₁, K₂, K₃ の標品各 100 nmol を濾紙にしみこませ、

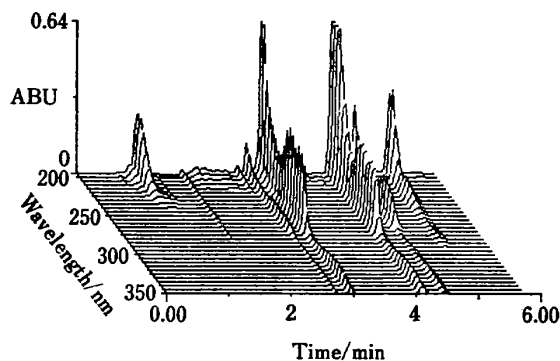


Fig. 2 Three-dimensional SFC chromatogram of vitamin K₁, K₂ and K₃ standards by directly coupled SFE/SFC

SFE conditions—pressure: 200 bar, temperature: 40°C, time: 2.5 min. SFC conditions—mobile phase: supercritical carbon dioxide/acetone (100 µl/min), total flow rate: 2.0 l/min as gas, column: JASCO Finepak SIL (4.6 mm i.d. × 250 mm); temperature: 40°C

暗所で十分乾燥した後その濾紙を抽出カートリッジに入れパッチ SFE を行った。抽出は、40°C, 200 bar の超臨界二酸化炭素を用いて 2.5 分間行った。この抽出物を、パルプの操作によって超臨界流体状態を保ったまま保持ループに移し、直接 SFC 装置に導入した。

SFC 条件は、カラムに Finepak SIL シリカゲルカラム、移動相として 40°C, 120 bar (カラム出口圧) の二酸化炭素を用い、流量は大気圧気体換算で 2.0 l/min とした。更にアセトニトリルを流量 0.1 ml/min で送液、混合しモディファイヤーとした。この条件下、ビタミン K₁, K₂ 及び K₃ の保持時間はそれぞれ 2.95, 4.09, 4.45 分であった。

Fig. 3 には、Fig. 2 のクロマトグラムから得られたビタミン K₁, K₂, K₃ それぞれのピークトップ吸収スペクトルを示した。本 SFC 条件下においてビタミン K₁, K₂, K₃ は 4.5 分以内に完全に分離することができた。分析時間がこのように短いのは、超臨界流体が、通常の溶媒に比べ粘性が 1/10 以下で、拡散係数も 100 倍ぐらい高いため、移動相線速度が約 10 mm/s と、通常の高速液体クロマトグラフィーに比べて 4~5 倍の高い値を用いることができるためである。ビタミン K₁ の直前 (2.6 分) のピークは K₁ のシス体であると考えられる。

ビタミン K₁ 標品の抽出のタイムコースを Fig. 4 に示す。この結果から濾紙に吸着させたビタミン K₁ は、約 15 秒以内に超臨界二酸化炭素中への溶解が平衡に達

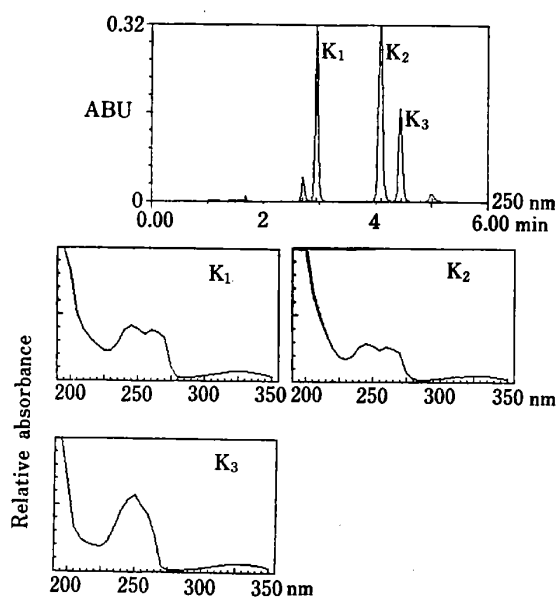


Fig. 3 Chromatogram and absorption spectra of vitamin Ks

Chromatogram monitored at 250 nm was data-reduced from the three-dimensional chromatogram in Fig. 2. UV spectra were taken at the chromatographic peak tops of vitamins K₁, K₂ and K₃.

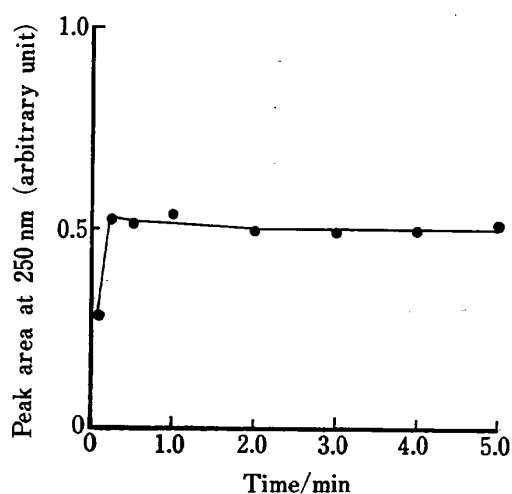


Fig. 4 Effect of time on extracted amount of vitamin K₁

SFE was performed at 40°C, 200 bar for indicated periods of time.

すると考えられる。抽出圧力の抽出量に対する影響は、抽出温度を 40°C、抽出時間を 2.5 分に固定し、抽出圧力を 100~200 bar まで変化させて抽出量を SFC 分析によって測定した。抽出量はこの実験範囲では、150 bar 以上ではほぼ一定値を示した。

以上の結果からビタミン K の測定には、少なくとも 15 秒以上の抽出時間、150 bar 以上の抽出圧力が必要であ

ることが分かった。

これらビタミン K 標品を用いた実験から、本装置を用いての SFE/SFC 直接導入法での再現性を調べたところ、保持時間に対する再現性は、相対標準偏差値として 1.5% 以内、又ピーク面積に対する再現性は、やや悪く 8% 以内であった ($n=10$)。しかし、抽出を行わずに SFC のみから得られるピーク面積の再現性は、10 回の実験で 2.0% 以内であり、前述した再現性は、SFE に強く依存していることが分かる。

ヒト血清 0.2 ml を沱紙にしみこませ、暗所で十分に乾燥させた後ビタミン K 標品と同様に、沱紙を抽出カートリッジに入れ 2.5 分間抽出を行った後、SFC 系に直接導入して得たクロマトグラムを Fig. 5 に示す。短波

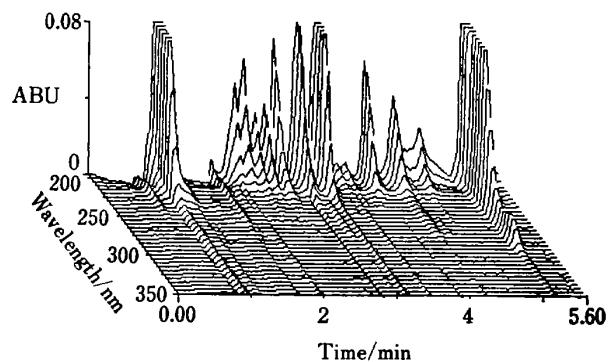


Fig. 5 Three-dimensional SFC chromatogram of serum obtained by SFE/SFC

Two hundred microliters of human serum were deposited on a piece of filter paper and dried under dark. Then the filter paper applied to SFE/SFC system. SFE was carried out at 40°C, 200 bar for 2.5 min. SFC was performed under the same conditions as in Fig. 2.

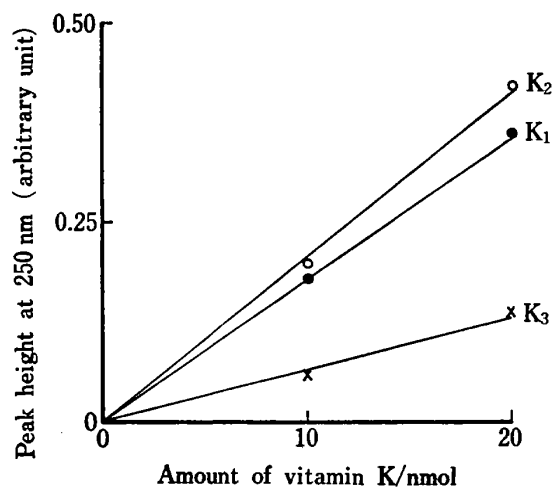


Fig. 6 Recoveries of vitamin Ks added to human serum

長にのみ吸収をもつ成分が多く分離されているが、ビタミンKと思われる吸収スペクトルをもつピークは見いだせなかった。Fig. 5 にみられる多くのピークは脂肪酸あるいは、脂肪類であろうと推測される。Fig. 6 は、Fig. 5 に示した血清 0.2 ml に対して 20 nmol 及び 10 nmol のビタミンKを添加して、回収試験を行った結果である。20 nmol 添加して得られた各ビタミンKのピーク面積は 10 nmol 添加して得られるそれぞれのピークに対して 2 倍の値を示した。

4 結 語

実験室規模での SFE/SFC 技術を用いることによって、特別な前処理をすることなく血清に添加したビタミンKの抽出を行い、その SFC クロマトグラムを容易に得ることができた。ビタミンKは、アルカリや紫外線に対して不安定であるが、SFE/SFC 技術を用いることによって、前処理を含めた分析時間が短縮でき、又二酸化炭素がビタミンKに不活性であり分析中の分解を少なくできる。血清中のビタミンKは、非常に微量であるため、今後、蛍光検出法などより検出感度の高い方法を応用することによって、血清中濃度の測定も可能になると思われる。

超臨界流体においては物質移動速度が液体におけるそれに比べて速いため、SFC ではカラム効率を低下させることなく分析時間を短縮することができる。更に超臨界二酸化炭素は、200 nm 付近の短い波長においても紫外線の透過が極めて良く、短波長側のより強い吸収を用いて高感度に物質を測定できる利点がある。更に実験室規模での SFE/SFC 手法を用いることによって、固体、液体などあらゆる性状の試料から特別な前処理をすることなく目的成分の抽出を行い、SFC クロマトグラムを容易に得ることができ、分析を迅速に行うことができる。

実際の SFE では、非常に多くの成分が抽出されるため、クロマトグラム上のピークの同定には、そのスペクトルを高感度で得られる MULTI-320 型検出器が有効である。又 SFE/SFC において比較的再現性の良いデータの得られることが分かったので、今後定量分析への応用も可能になると思われる。

本研究を進める過程で適切な御忠告、御指導をいただきました慶応義塾大学医学部薬化学研究所の星野忠夫博士、又ビタミン K₂ 標品を御提供いただきました三共(株)生産技術研究所の妹尾節哉博士に深謝いたします。

文 献

- 1) J. B. Hannay, J. Hogarth: *Proc. R. Soc. (London)*, **29**, 324 (1979).
- 2) K. Zosel: "Extraction with Supercritical Gases", (1980). (Verlag Chemi, Weinheim).
- 3) M. Saito, K. Sugiyama, T. Hondo, M. Senda, S. Tohei: Abstracts International HPLC symposium p.84 (1985), Kyoto.
- 4) K. Sugiyama, M. Saito, T. Honda, M. Senda: *J. Chromatogr.*, **332**, 107 (1985).
- 5) 斎藤宗雄, 本堂敏信, 千田正昭, 杉山謙吉: 日本農芸化学会 60 年度大会講演要旨集, p. 157 (1985).
- 6) 杉山謙吉, 斎藤宗雄, 本堂敏信, 千田正昭: 日本農芸化学会 60 年度大会講演要旨集, p. 158 (1985).
- 7) 本堂敏信, 斎藤宗雄, 杉山謙吉, 星野忠夫, 千田正昭: 日本農芸化学会 60 年度大会講演要旨集, p. 158 (1985).

☆

Analysis of vitamin K by directry coupled supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography. Toshinobu HONDO, Muneeo SARTO and Masaaki SENDA (Japan Spectroscopic Co., Ltd., 2967-5, Ishikawa-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192)

We have already reported the new double-stage separation method which combines supercritical fluid extraction (SFE) directly with supercritical fluid chromatography (SFC). The new SFE/SFC method incorporates SFE as the first separation step and SFC as the second separation step. This arrangement allows the analyst to apply raw and solid samples directly to the system. In addition, the use of SFE/SFC enables true SFC which is not affected by the solvent, that often plays a role of modifier only for early eluting peaks, used for dissolving samples. Here, application of this method to the analysis of vitamin Ks is described. A solution of vitamins K₁, K₂ and K₃ were dried on a piece of filter paper, then applied to the SFE/SFC system. Stopped-flow extraction was performed at 40 °C with 200 bar pressure for 2.5 min, then the extract was directly introduced into the SFC system. All the three vitamins were completely separated on a silica gel column within 4.5 min using supercritical carbon dioxide (2.0 l/min) with acetonitrile (0.1 ml/min) as a modifier. The relative standard deviation of the retention times was less than 2.0% for ten consecutive runs.

(Received September 30, 1985)

Keyword phrases

vitamine K in human serum; supercritical fluid extraction; supercritical fluid chromatography.