



Title	超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を基盤としたカロテノイドの分析技術開発
Author(s)	松原, 惇起
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24735
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を基盤とした
カロテノイドの分析技術の開発

2012年

松原 惇起

目次

第一章 緒論	1
第二章 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いたカロテノイド分析法の開発	
2-1. 緒言	11
2-2. 実験方法	
2-2-1. 試薬	14
2-2-2. 装置	15
2-2-3. カラム	15
2-2-4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の培養条件	16
2-2-5. <i>C. reinhardtii</i> からのカロテノイド抽出	16
2-2-6. カロテノイド類の代謝変動解析	16
2-3. - 結果	
2-3-1. MS におけるイオン化条件の検討	18
2-3-2. SFC における分離条件の検討	19
2-3-3. モノリスカラムの適用	22
2-3-4. 検出下限値	25
2-3-5. モノリスカラムの連結による高分離の分析系の構築	26
2-3-6. <i>C. reinhardtii</i> の各種環境ストレス条件下における代謝変動解析	28
2-4. 考察	31

第三章 超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析を用いたカロテノイドエポキシド分析系の構築	
3-1. 緒言	34
3-2. 実験方法	
3-2-1. 試薬	37
3-2-2. 装置	37
3-2-3. 分析条件	39
3-2-4. カラム	40
3-2-5. カロテノイドのエポキシ化	40
3-2-6. 血清および低密度リポタンパク質からのカロテノイド抽出液の調製	40
3-3. 結果	
3-3-1. 検出条件の検討	41
3-3-2. 分離条件の検討	43
3-3-3. 実サンプルへの適用	50
3-4. 考察	54
第四章 総括	57
謝辞	60
引用文献	61
発表論文	73
学会発表	76

第一章 緒論

超臨界流体 (supercritical fluid : SF) とは臨界点を越えた温度および圧力下においた物質の状態を示す (図 1-1) ¹⁻⁵. 相図において, 固体, 液体および気体の状態に対応する領域は明確に区別できる. しかし, 臨界温度以上では液体と気体は同じ密度をとることができ, そのような流体は圧力を上げてても液化することはできない. SF の物理的な性質を表 1-1 に示した ¹. 臨界点以上で物質は液体に近い密度と溶媒和力を持つ. しかし, その粘度は気体に近く, 拡散係数は気体と液体の間である. また, 分子間相互作用が十分に強い状態では, SF は高分子や低揮発性化合物などさまざまな溶質を溶かすことができる ⁶⁻⁸. さらに, これらの溶媒特性は圧力や温度を制御することにより大幅にかつ連続的に変化させることができ, 単一媒体で幅広い物性を示すことが可能である ¹⁻⁵. すべての物質に超臨界領域が存在する (表 1-2) が, 学術的にも産業的にも重要な物質は超臨界水と超臨界二酸化炭素 (supercritical carbon dioxide : SCCO₂) であり, 上記のユニークな特性からさまざまな用途に応用されている (表 1-3) ¹.

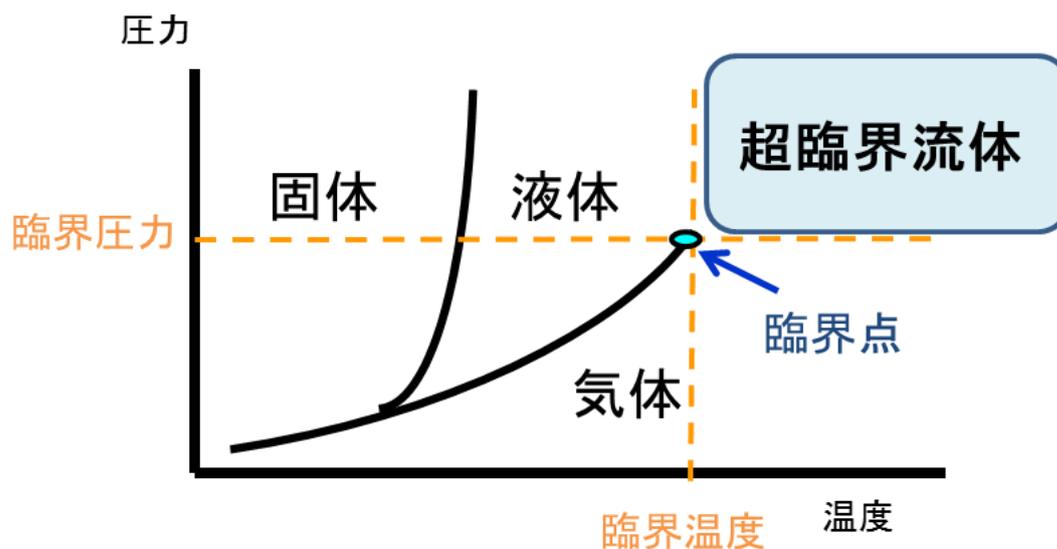


図 1-1 物質の相図

表 1-1 物質の各状態における物理的性質¹

物性	気体	超臨界流体	液体
密度 [kg・m ⁻³]	0.6～2	300～900	700～1600
拡散係数 [10 ⁻⁹ m ² ・s ⁻¹]	1000～4000	20～700	0.2～2
粘度 [10 ⁻⁵ Pa・s]	1～3	1～9	200～300

表 1-2 物質の臨界点¹

物質	臨界温度 [°C]	臨界圧力 [atm]
二酸化炭素	31.3	72.9
水	374.2	218.3
亜酸化窒素	36.5	72.5
アンモニア	132.5	112.5
メタン	-82.8	45.4
エタン	32.2	48.1
メタノール	239.5	79.8
エタノール	240.8	60.6
キセノン	16.6	58.4

表 1-3 超臨界流体の用途

用途	具体例
抽出	エッセンシャルオイルの抽出 カフェインレスコーヒーなど
機能性加工 材料形成	工業製品の洗浄, 乾燥, 染色 微粒子, ナノカプセルの製造
反応	超臨界水による酸化反応 木質バイオマスの化学変換

超臨界二酸化炭素は臨界温度が室温に近いという特性があるため、抽出・有機合成・材料合成へ適用されやすい。抽出溶媒として超臨界流体を用いる超臨界流体抽出は、抽出物の収率および純度が高いため、天然物からの各種フレーバや薬効成分の抽出に用いられている⁹⁻¹¹。また、高圧で抽出した後低圧に戻すことで溶媒が気体となってなくなるため、食

品等溶媒の処理が問題となる分野に有用である。また、機能性加工の領域では、SFの高拡散性、低粘性により微細構造への浸透に優れる性質をいかし、洗浄や乾燥、染色などが行われている¹²。さらに溶媒特性を大きく変化させることができることから、過飽和度の調節がキーとなる微粒子製造にも用いられている。超臨界水は常温常圧で水素結合に基づくネットワークが形成されている水と比較して、誘電率やイオン積などの特性が大きく変化している。例えば、水の比誘電率は常温常圧で約80であるが、臨界点を超えると2~20に著しく減少し、有機物質も溶解させることができるようになる。また、一部が水素イオンおよび水酸化物イオンに分解されているため、酸および塩基触媒を必要としない。さらに高密度かつ高温であるため、反応がすみやかに進行するなどの特徴を有し、ダイオキシンやPCBなどの有害有機物質の分解反応の場として期待されている。超臨界水やSCCO₂を用いた各種反応は、有機溶媒の使用量の削減や高速、高選択的な反応を実現するため、グリーンケミストリーを志向した環境負荷低減技術の一つとして近年期待されている¹³。加えて、近年では木質バイオマスの加水分解による資化可能な糖類の生成にも超臨界水が応用されている¹⁴。また、超臨界メタノールを用いて木質バイオマスを液化することにより、直接液体燃料を得る試みも行われている¹⁵。

SFは拡散性と溶解性を兼ね備えるため、クロマトグラフィーの移動相としても好ましい性質を有している。超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical fluid chromatography: SFC) には、移動相として無毒性、取り扱いの簡便性から超臨界流体二酸化炭素が主に用いられ、そのユニークな性質に由来する以下の特徴を有する^{4,5}。

1. ガスクロマトグラフィー (gas chromatography: GC) においては熱分解性や高沸点のために分析が困難な化合物にも適用可能である。

2. SFは拡散係数が高いため、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) に比べてクロマトグラフィーにおける分離能が大幅に向上する。また、van deemeter curveにおいて高い流速においても理論段高さが保たれるため、分析

時間を短縮することができる。

3. 温度と圧力を制御することで超臨界流体の溶質の溶解度を大幅に変化させることができるため、単一の流体で溶出力を調節することが可能である。また、モディファイヤーとしてメタノールなどの有機溶媒を少量添加することで溶出力の選択範囲はさらに広がる。
4. 二酸化炭素などの常温で気体として存在する物質を移動相として用いた場合、分取クロマトグラフィーを行った後に得られたフラクションから移動相が自動的に揮散するため、溶媒留去という時間とエネルギーを消費するプロセスを省くことができる。

SFC の最初の報告は 1962 年の Klesper らによるポルフィリン類の分離であり¹⁶、1966 年に発表された HPLC よりも早い時期に登場した⁴⁵。しかしながら文献検索サービスである Scifinder によると、HPLC の年間報告数が 1980 年には年間 1000 報を超え、現在では 3000 報以上が年間に報告されているのとは対照的に、SFC は 1989 年の 173 報がピークで現在では年 100 報程度とその数は減少傾向にある（図 1-2）。SFC が優れた特性を持つにも関わらず、SFC の応用が限定されている背景には、移動相としての超臨界流体二酸化炭素の特性解析が遅れたことと、それに伴う SFC の技術開発の迷走がある。

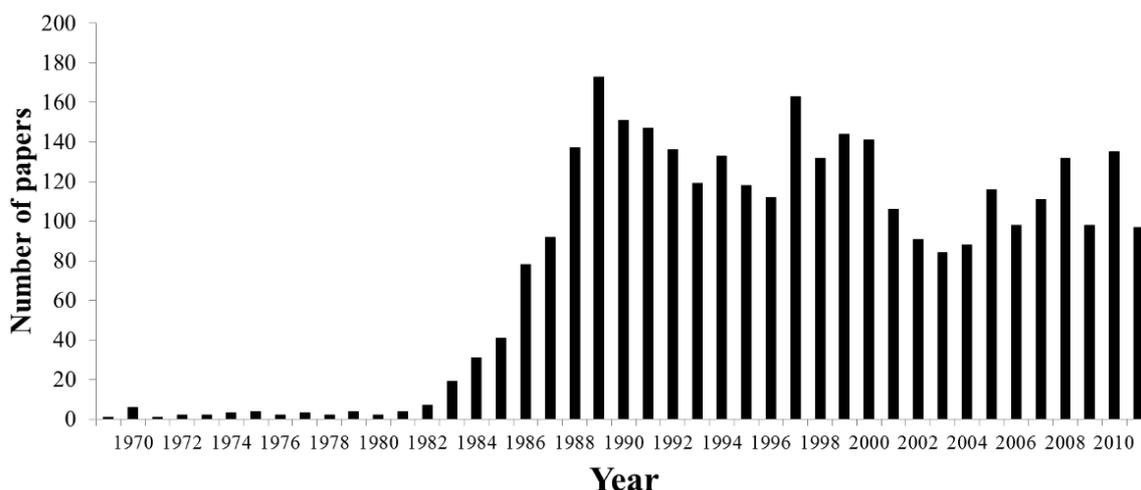


図 1-2 SciFinder Scholar によるキーワード”Supercritical fluid chromatography” 文献検索結果

当初、SFCは主に中空キャピラリーカラムを用いたキャピラリーSFCとして運用されてきた^{4,5}。キャピラリーSFCでは、長い中空キャピラリーカラムを用いることでGCのような高理論段の分析を行なうことができ、さらに、GCでは分析できない不揮発性物質や熱分解性物質にも適用できる。キャピラリーSFCが初めて報告されたのは1982年のSFC国際学会であり、その年にはHPLCをベースとした充填カラムSFCがHewlett-Packard社より発表されていた。それにも関わらず、SFCの技術開発の中心がキャピラリーSFCへと傾いていったのは、検出器を当時HPLCよりも普及していたGCと共有できることや、キャピラリーSFCを用いて行われたポリマーなどの分析例が優れたものであったからであると考えられる⁵。しかし1985年にキャピラリーSFCシステムが市販されるとSFCが抱える問題が明らかとなり広く普及するには至らなかった。気体よりも密度の高いSF₆を移動相として用いると、最適線速度は気体を用いるよりも低いため、理論段数あたりの分析時間はGCよりも長くなる。高い理論段数を得るには数時間以上もの長い分析時間を要するため、最適な線速度の10倍以上の速度をもって分析が行われ、期待したような分離を得ることが困難であることが明らかになった⁵。さらに超臨界流体二酸化炭素の極性が想定されていた(イソプロパノール程度)¹⁷よりも低く、物質の溶解性にも問題が生じた。製薬企業で分析対象となるような低分子で比較的極性の高い化合物の分離に用いることができないことがわかった。これはモディファイヤーを少量しか添加できないキャピラリーSFCにおいては致命的な欠点であった。こうした経緯から、SFCは分析技術としての運用が減少した。

近年になり、SFCの有用性は充填カラムを用いた分取クロマトグラフィーにおいて見出された^{4,5,18,19}。これは既に述べたとおり、移動相である二酸化炭素が分取後揮散すること、また、分離効率がHPLCと比べて高いことから、充填カラムSFCが非常に高い分取効率を示すためである。現在ではSFCの技術開発は、従来技術に対する優位性が明確な分取システムを中心に行われており、特にキラルカラムと組み合わせにより、薬品原料等の光学活性体生産の重要技術となりつつある。その一方で、代謝物分析を含む他の用途には積極的

に利用されていないのが現状である。

代謝物解析は遺伝子、転写産物、タンパク質の解析とならび、細胞に起こる生理現象を正しく理解するために重要な戦略である。特に近年、遺伝情報を伝える他の分子群の解析と同様に、代謝物解析でも多成分を一斉分析することで複雑な生物システムを理解しようとする試みが行われている^{20,21}。しかしながら他の解析に比べて対象とする分子群の化学的性質が多岐に渡るため、分析技術の一般化が遅れている。代謝物解析は主に被験化合物の定性情報、すなわち分子量および構造情報を得ることができるとともに、高感度の定量が可能な質量分析および GC、LC、キャピラリー電気泳動 (CE) などの分離技術と組み合わせで行われている。SFC を代謝物解析に用いた場合には、以下の利点を期待することができる。

1. 高分離のため、夾雑成分による分析の妨害を避けることができる。特に大気圧下イオン化法においては共溶出化合物によるイオン化阻害あるいはイオン化促進効果は大きな問題となる。
2. 高速分離により多検体の分析に有利である。
3. 超臨界流体二酸化炭素はヘキサン程度の低極性であるため、疎水性代謝物を溶解することができる。さらに移動相の極性はメタノールなどの極性溶媒を添加することで大幅に変化させることが可能である。

これらの特徴を鑑みると、SFC は優れた代謝物分析手法となりうると考えられる。そこで、まず代謝物分析に必須の質量分析との接続システムを開発し、脂質の分析系を構築することで、その有用性を検証した。順相カラムであるシアノカラムを用いることでリン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、中性脂質を含み、幅広い極性を有する脂質を 20 分以内に分離することができることが分かった (図 1-3)²²。このことは、SFC の高速高分離性能を改めて示している。さらに逆相カラムである ODS カラムを用いた場合には脂肪酸のバリエーション認識し、分離できることが分かった。これまで SFC にはキラルカラムが用いられる

ことが多かったが、カラムの特性を解析することで、さまざまな物質の分離に有用であることが示唆された。このことは SFC が脂溶性代謝物分析の有望な分離技術であり、SFC/MS が代謝物解析技術の新たな重要技術となりうることを示唆した。

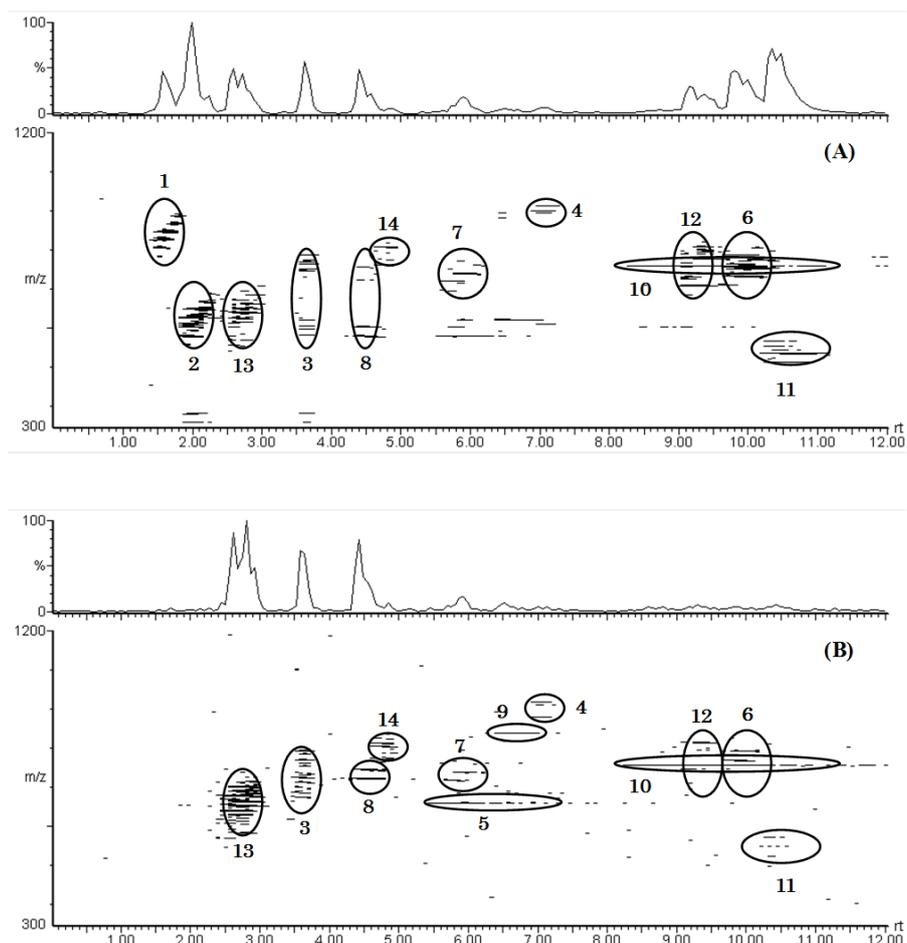


図 1-3 シアノカラムを用いた SFC/MS による脂質混合物の分析により得られた 2 次元 MAP²². (A)ポジティブイオンモード, (B)ネガティブイオンモード. 測定化合物 1, TG; 2, DG; 3, MGDG; 4, DGDG; 5, PA; 6, PC; 7, PE; 8, PG; 9, PI; 10, PS; 11, LPC; 12, SM; 13, Cer;分析条件 mobile phase, CO₂; modifier, methanol with 0.1% (w/v) ammonium formate 10-30% in 20 min; flow rate, 3.0 mL/min; backpressure, 10 MPa; and column, Berger CYANO (4.6x250 mm I.D., 6 μm particle)

カロテノイドは8個のイソプレレン単位が結合して合成されるC40イソプレノイドである。中央部の長い共役二重結合と両側の末端基を部分構造として有し、末端基の構造が異なる構造類縁体が多数存在する²³。

カロテノイドは太陽光があたる環境で生育する幅広い生物種に存在すると考えられている。カロテノイドは光による障害に対する保護作用を有していることから、光合成によりエネルギーを獲得する植物、藻類、光合成細菌ではカロテノイドの存在は必須である。動物においてカロテノイドは鳥類の羽毛、卵黄、魚類の体表、卵黄、海産動物の体表などに多く含まれている²³。

植物において、カロテノイドは光エネルギーを吸収して光化学反応の中心であるクロロフィルにエネルギーを渡す光捕集（増感）作用を有している一方で、過剰な光エネルギーによってもたらされる障害を防ぐ光障害防御作用も有している²⁴。このカロテノイドの光障害防御作用は励起エネルギー移動による一重項酸素の消去、電子授受によるフリーラジカル消去作用に加え、キサントフィルサイクル^{25,26}というカロテノイド生合成酵素と共役し高度に発達した光化学系障害防止機構によるものがあり、カロテノイドが光合成を行なう植物の生命維持に特に重要な物質として利用されていることが分かる。

動物においてもカロテノイドは脂溶性の抗酸化物質として重要である²⁷。ヒトの表皮や皮下組織にはカロテノイドが高濃度で含まれ、主に可視光によって生成した活性酸素やラジカルの消去に寄与していると考えられている²³。脳心血管系障害²⁸⁻³⁰、代謝症候群^{31,32}、肥満³³、糖尿病³⁴、白内障^{35,36}、乳がん^{37,38}、前立腺がん^{39,40}、肺がん⁴¹、消化器がん^{42,43}などの多くの疾患において有病率と血中カロテノイド濃度が負の相関を示すことが明らかにされており、抗酸化作用を通じ、カロテノイドがヒトの健康維持に重要な物質であることが示唆されている。

また、カロテノイドは自然界を彩る色素でもある。カロテノイドは威嚇、隠蔽や性的識別などのための標識色素として植物においては果実、花卉^{24,44}など、動物においても体表

や鳥類における羽毛⁴⁵などに多く含まれており、生存戦略上重要な色素であると考えられる。生物種によって異なるカロテノイド生合成経路を発展させており⁴⁶⁻⁴⁸、代謝研究も盛んに行われている。

さらにカロテノイドは重要な生理活性物質の前駆体である。カロテノイドはビタミン A の前駆体であり、動物において視覚^{49,50}、形態形成制御作用、細胞の分化増殖制御^{51,52}などの生理作用に関与している。また植物においても気孔開閉^{53,54}、種子の休眠^{55,56}、や各種環境ストレス応答^{57,58}に関わる植物ホルモンであるアブシジン酸の前駆体である。このアブシジン酸は細胞内寄生性原虫であるトキソプラズマにおいても宿主細胞からの脱出を司るシグナル分子として利用されていることが明らかにされている⁵⁹。ことから、カロテノイドの代謝物がさまざまな生理活性を制御する分子として幅広い生物種で利用されていることをうかがい知ることができる。近年、アブシジン酸と同様にカロテノイド酸化開裂物を前駆体とするストリゴラクトンが分枝を制御する植物ホルモンとして同定され^{60,61}、動物においてもレチナル生合成酵素以外のカロテノイド酸化開裂酵素がミトコンドリアの酸化的障害の保護作用に関与していることが明らかになる⁶²など、カロテノイドおよびその代謝物が持つ生理機能についての関心が高まっている。

以上よりカロテノイドは代謝解析のターゲットとして重要な分子群であると考えられるが、高い疎水性および構造類縁体が多数存在することから、従来法による迅速分析は困難である。例えば、末端環構造上の二重結合の位置のみ異なる構造異性体であるルテインとゼアキサンチン（図 2-1）は、数百症例以上を対象とした多くの疫学的調査において混合物として検出、定量されている^{30,33,37,42,43}。これは、構造の類似したこれらのカロテノイドを分離するのは困難であり、分離できたとしても長い分析時間を要するため、スループットが重視される多検体の分析が必要となる研究においては、分離せずに分析が行われたことが理由として考えられる。しかし、これらの 2 つの分子の生体内における機能は異なることが知られている。例えばルテインとゼアキサンチンは両分子ともヒトの黄斑に存在する

カロテノイドとして知られているが、黄斑の中心部においてはゼアキサントフィルの存在比が、周辺部においてはルテインの存在比が高く、共役二重結合数の異なり吸収極大波長の異なるこれらのカロテノイドが、異なる機能を担っている可能性が示唆されている⁶³。また、抗酸化機能も異なる。アリル位にヒドロキシ基を持つルテインは、この部分が酸化されやすく、比較的に安定なラジカルカチオンを生じる⁶³ため、フリーラジカルの消去に有用であると考えられる。一方、ルテインよりも長い共役二重結合を有するゼアキサントフィルは一重項酸素の励起エネルギー授受による物理的機構による消去において有利であると考えられている。このことから、カロテノイドの機能を詳細に解析するためには構造が類似したカロテノイドを分離でき、なおかつ多検体分析に対応した高速分析系の構築が望まれる。

本研究では、これまでキラル分取などの限定された範囲にしか応用されてこなかったSFC/MSが、脂溶性代謝物の有望な分析技術であり、生体システムにおけるカロテノイドの機能を解明するための技術的なブレークスルーとなりうることを示すことを目的とした。まず、カロテノイド分析におけるSFC/MSのスペックを確認し、どこに有用性があるかを調べた。次に、従来法では分離や検出感度の点で分析が難しいカロテノイドエポキシドをターゲットとした分析系を構築し、SFC/MSの脂溶性代謝物分析における潜在能力を検証した。

第二章 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた

カロテノイド分析法の開発

2-1. 緒言

カロテノイド類には構造類縁体が多数存在し、また、蓄積量が非常に微量な成分も存在することから、生体試料の分析においては高度な分離技術が必要とされる。従来、カロテノイドの分離分析には、カラムクロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーが用いられてきたが、最近では高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) が汎用されている。順相モードの HPLC では主に対象化合物の極性の違いが認識され、分離されるが、構造異性体などの構造類縁体を分離することは困難である。逆相 HPLC では通常用いられる C18 カラムよりも長いアルキル基を有する C30 カラムが Carotenoid column として開発され、カロテノイド分析に用いられている^{64,65}。C30 カラムを用いることで極性の違いだけでなく、立体異性体を含む構造異性体の分離も行なうことができるが、分析に長い時間を要する^{64,65}。

一方、検出器としては一般的に可視光検出器やフォトダイオードアレイ検出器などの吸光度検出器が用いられる。カロテノイドはイソプレン骨格に長い共役系を有しており、主に可視光領域に強い吸収を持っている。吸収波長や強度は、共役系の長さや末端部に位置する官能基により影響を受けて変化するため、420-480 nm の波長領域の吸収をモニターすることにより、カロテノイドの部分的な構造情報を獲得することが可能である^{64,65}。しかし異性体や構造類縁体などの夾雑物の影響を受けたり、検出感度が低いなどの問題を抱えている。質量分析計はこれらの問題を解決できる可能性を有している。 m/z により分子量、それに基づく官能基の情報を獲得可能である。また、タンデム型質量分析計を用いてフラグメント情報を得ることでさらに部分構造に関する情報を獲得することができる。LC に

接続する MS のイオン化法としてはエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization: ESI) 法および大気圧化学イオン化 (Atmospheric pressure chemical ionization: APCI) 法が広く用いられている。ESI は帯電した微細な霧として噴霧された試料溶液が、乾燥ガスと霧に帯電した電荷の反発により更に微細化し、気化してイオンを生成する⁶⁶ イオン化法であり中～高極性化合物に適したイオン化とされる。APCI はヒーターや乾燥ガスにより試料を気化し、そのガス中でコロナ放電を行なうことでイオン化する手法⁶⁷ であり、低～中極性化合物のイオン化に適している。MS は光度計よりも感度および選択性に優れており、特に ESI 法を用いた MS は代謝物分析によく用いられている。しかしながら質量分析における検出感度はイオン生成の反応の場である LC の溶離液の組成に強く影響を受けることが知られている。脂溶性の高いカロテノイドを溶出するために、逆相 HPLC では低極性の methyl tert-butyl ether (MTBE) や酢酸エチルなどが溶媒として用いられる^{64,65}。これらの極性の低い溶媒では、溶媒自身がイオン化する必要がある ESI やイオン化にプロトンが必要とする APCI におけるイオン化効率が低下し、期待されるような感度を得ることができていない^{68,69}。

一方、逆相カラムを用いた SFC/MS では SCCO₂/メタノールグラジエントによりトリアシルグリセロールなどの低極性脂質を溶出、ESI 法により良好にイオン化されることを確認している²²。このため、SFC/MS は上記の逆相 LC/MS の感度低下という問題を解決できる可能性がある。

さらに、前章でも述べたとおり、SFC は脂溶性代謝物の分離分析に有用であることから、カロテノイドの効率的な分離が期待される。これまでに SFC をカロテノイド分離の応用例が報告されている。Schmitz らは、中空キャピラリーカラム SFC を用い、熱分解のため GC による分析ができず、また当時液体クロマトグラフィーによる分離の難しかったカロテノイド類を SFC が良好に分離できることを示した⁷⁰。また、Ibañez らは 50 cm の粒子充填キャピラリーカラムを用い、モディファイヤーを使用せず、300 atm 程度の SCCO₂ によりベ-

タカロテンおよび異性体であるリコペンの 10 分程度の短時間による分離を達成している⁷². Lesellier らは粒子充填カラムを用いたカロテノイドの温度, 圧力, モディファイヤー, カラム固定相などのさまざまな分析条件の詳細な検討を行っている⁷²⁻⁷⁴. 彼らはこれらの研究を進展させ, ベータカロテンのシストランス異性体の分離およびベータカロテンとゼアキサントチンの分離を評価することにより SFC および HPLC におけるカラムの特性 (bonding density, hydrophobicity, polar sites accessibility) 解析を試みており⁷⁵⁻⁷⁹, 特にモノリス型カラムが立体異性体の分離に有用であることを報告している⁸⁰.

モノリス型シリカカラムは新しいゾル-ゲル法によってつくられ, 大きなマクロポア (直径約 2 μm で粒子充填型シリカカラムの粒子間隙に相当する) とメソポア (直径平均 13 nm で, シリカ粒子表面の細孔に相当する) からなる⁸¹⁻⁸³. モノリス型カラムは粒子充填型カラムに比べて大きな流路を確保できるため, 低圧送液が可能である⁸³. その特性により, 高流速分析による分析時間の短縮や, 連結による分離能の向上が達成されており^{83,84}, LC の高性能化に有用であることが示されている.

そこで, 本章では, カロテノイド分析のモデルケースとして, 構造異性体を含む植物のカロテノイド生合成経路の中間体 (リコペン(lycopene), ベータカロテン(β -carotene), ルテイン(lutein), ゼアキサントチン(zeaxanthin), アンテラキサントチン(antheraxanthin), ネオキサントチン(neoxanthin), ビオラキサントチン(violaxanthin)) の SFC/MS による分析系の構築を試みた. 選択性や感度など代謝物解析における重要な仕様について調査し, 超臨界流体クロマトグラフィーの質量分析との接続システムのカロテノイド分析における有用性を検証した.

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

本研究において使用した試薬類は特に示さない限り、ナカライテスク社製 特級試薬を用いた。SFC の移動相に用いた二酸化炭素（純度 99.9%）はネリキガスから購入した。モデルファイヤーとして用いた HPLC グレードのメタノールは和光純薬から、添加剤として用いたギ酸アンモニウムはシグマアルドリッチから購入した。ナカライテスクから購入したベータカロテン、Extrasynthese から購入したゼアキサントシン、DHI から購入したリコペン、ルテイン、アンテラキサントシン、ネオキサントシンとビオラキサントシンをカロテノイド標準品として用いた（図 2-1）。

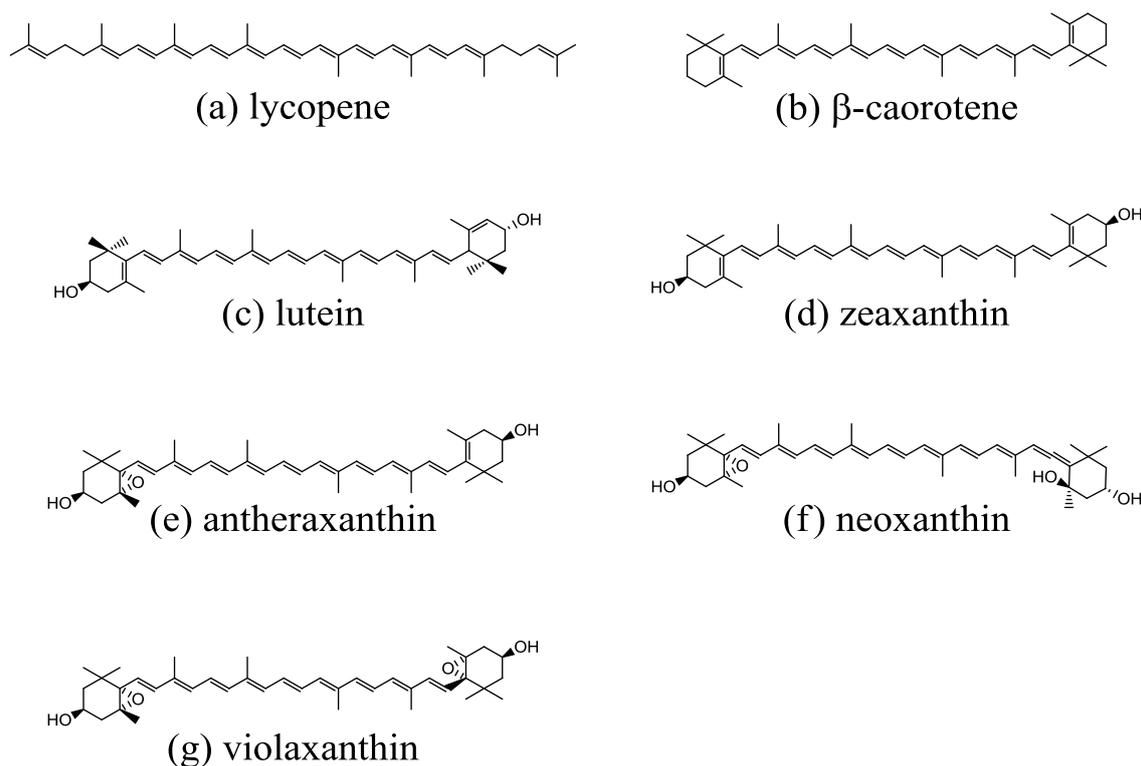


図 2-1 分析対象のカロテノイド

2-2-2. 装置

SFC 装置は Berger SFC Analytix (Waters) , 質量分析計は ZQ2000 (Waters) を用いた。またイオン化を促進するメイクアップ液の送液には Agilent 1100 series isocratic pump (Agilent Technologies) を用いた。用いた装置類の写真を図 2-2 に示す。



図 2-2 SFC-MS 装置

2-2-3. カラム

Inertsil ODS-3 (モノメリック ODS 固定相, 250 × 4.6 mm ID; GL Sciences) , Inertsil ODS-P (ポリメリック ODS 固定相, 250 × 4.6 mm ID; GL Sciences) , Hibar Purospher STAR RP-18e (モノメリック ODS 固定相, 250 × 4.6 mm ID; Merck) と Chromolith® Performance RP-18e (モノリス型 ODS カラム, 100 × 4.6 mm ID; Merck)を用いた。

2-2-4. *Chlamydomonas reinhardtii* の培養条件

真核生物淡水性緑藻 *C. reinhardtii* (IAM-239 株) の培養には Modified Bristol Medium (MBM: 表 2-1) を用いた。直径 45 mm, 培養容積 200 mL の試験管を用い, 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯照射下, 28°Cにて培養した。この際 1% 二酸化炭素を含む空気を流速 30 mL/min で通気した。試験には, 特に示さない限り, この条件で培養した細胞を用いた。

2-2-5. *C. reinhardtii* からのカロテノイド抽出

凍結乾燥した *C. reinhardtii* をボールミル (MM301, Retsch) により凍結破碎 (20 Hz, 30 秒) し, その後 2 ml のアセトン (純度 99.5%以上, 和光純薬) を用いて抽出した。抽出物は 1 分間ボルテックス, 10 分間超音波破碎を行い, 4°C, 20000 x g の条件で 5 分間遠心分離した上清を回収し, SFC-MS 分析に供した。

2-2-6. カロテノイド類の代謝変動解析

24 時間前培養した 200 ml の *C. reinhardtii* 培養液にソルビトール, パラコートおよび塩化ナトリウムをそれぞれ最終濃度 0.4 M, 100 nM, 0.1 M となるように添加し 1.5, 3, 6, 12, 24 時間後に 20 ml ずつサンプリングした。次に遠心分離 (3000 x g, 25°C, 10 min) により得られた藻体ペレットを凍結乾燥機 (FREEZONE 1L LABOCONCO) により凍結乾燥した後,

表 2-1 MBM 培地の組成

KNO ₃	250 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75 mg
K ₂ HPO ₄	75 mg
KH ₂ PO ₄	175 mg
NaCl	25 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg
Fe solution*	1 mL
A5 solution**	1 mL
Dist.water	
1000 ml (Adjusted to pH 6.0)	
*Fe solution	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	3.15 g
Dist.water	
Conc.H ₂ SO ₄	2 drops
**A5 solution	
H ₃ BO ₃	286 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O	250 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.2 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	7.9 mg
Na ₂ MoO ₄	2.1 mg
Dist.water	
1000 mL	

2-2-5 に記した方法により，カロテノイドの抽出を行い，SFC/MS に供した.

2-3. 結果

2-3-1. MS におけるイオン化条件の検討

まず固定相に粒子充填型のシアノカラム，移動相に 0.1%のギ酸アンモニウムを含むメタノールを添加した超臨界二酸化炭素 (SCCO₂) を用いた SFC の条件下で，カロテノイド標準品を測定し，質量分析計のイオン化条件について検討を行った．先にも述べたとおり，一般的にカロテノイド類などの疎水性の高い化合物の分析には APCI 法が用いられることが多い⁶⁸が，ESI においても良好なイオン化が認められた．この原因の一つに，移動相の組成が ESI におけるイオン化に有利な条件であったことが考えられる．特にイオン化部の圧力条件では，二酸化炭素は気体として存在しておりイオン化に有利なメタノールに富む条件でイオン化が行われていると考えられる．これまでに ESI プローブを用いたインターフェイスの構築および流量等の最適化ができているため²²，本研究においては，ESI によるイオン化を採用し，イオン化条件を最適化した．本論文における分析は以下に示す条件で行った (表 2-2)．

表 2-2 MS の分析条件

scan range	<i>m/z</i> 300-1200
capillary voltage	3.0 kV
cone voltage	30 V
extractor voltage	2.0 V
RF lens voltage	0.2 V
source temperature	120°C
make-up liquid	methanol with 0.1% (w/w) ammonium formate
make-up flow rate	0.1 ml/min

2-3-2. SFC における分離条件の検討

次に、SFC における分離条件の検討を行った。分析条件は表 2-3 に示した。SFC では、移動相である SCCO₂ の極性がヘキサン程度と低極性であると考えられているため、シリカ、ジオール、アミノなどの順相（シリカ、ジオール、アミノ）固定相を持つカラムが主に用いられている。しかしながら、順相系のカラムを用いた場合、カロテノイド類の保持が弱く、HPLC と同様に異性体の分離ができなかったため、(data not shown) ので、次に C18 カラムを用いることを検討した。C18 は HPLC において汎用されているカラムである。モノメリックタイプの C18 (Inertsil ODS-3, 炭素含有率 17%) カラムの適用を試みたところ、逆相 HPLC と同じように、極性の高いものから順に溶出した (図 2-3A)。一般的に逆相 HPLC では溶媒の極性を低下させることで溶媒強度を上げるが、SFC の場合、極性溶媒であるメタノール濃度の増加により溶媒強度が上昇したことから、HPLC とは根本的に異なる機構で化合物とカラム間の相互作用が起こっていることが予想された。Lesellier は、逆相カラムを SFC で用いた際の溶離挙動は、以下の機構によるものであると推定している⁸⁵。

- 1) メタノールを添加した条件では臨界点に変化し、実際には亜臨界の状態で行われている。この条件下では、物質の移動度は溶媒の量（メタノールの割合）に依存する。
- 2) 固定相の極性が、モディファイヤーが溶解することにより変化する。メタノール濃度が高ければ固定相の極性は上がり、保持能力が低下する。

表 2-3 SFC の分析条件

outlet pressure	10 MPa
column temperature	35 °C
mobile phase	SCCO ₂
modifier	methanol with 0.1% ammonium formate 10–30% 20 min
flow rate	3 ml/min

すべてのカロテノイドは 20 分程度と比較的早く溶出されたが、構造異性体（ベータカロテンとリコペン、ネオキササンチンとビオラキササンチン）を分離することができなかった（図 2-3A）。

次にポリメリックタイプのカラムの適用を試みた。ポリメリックタイプの C18 カラムでは高密度にアルキル鎖が存在することから高い炭素含有率を示し、モノメリックタイプの C18 カラムに対して立体選択性に優れるとされる。同じメーカー製でポリメリックタイプの C18 カラム（Inertsil ODS-P、炭素含有率 29%）で分析したところ、構造異性体は分離することができたが、分子量が異なるキサントフィルが同時に溶出した（図 2-3B）。これはエンドキャッピング処理が施されていない ODS-P カラムでは残存シラノール基と分析対象物との水素結合性相互作用が強く現れたためであると考えられる。さらにエンドキャッピングの施された先の 2 つのカラムとは異なるメーカーのポリメリックタイプの ODS カラム（Hibar Purosphere STAR RP-18e、炭素含有率 19%）を用いたところ、炭素含有率が近いモノメリックタイプの Inertsil ODS-3 に近い溶出挙動を示したが、構造異性体の分離が改善し、7 種のカロテノイドを 15 分で分離できた（図 2-3C）。これはポリメリックタイプであり立体選択性に優れることに加え、エンドキャッピングにより水素結合性相互作用が減弱されていたためであると考えられる。

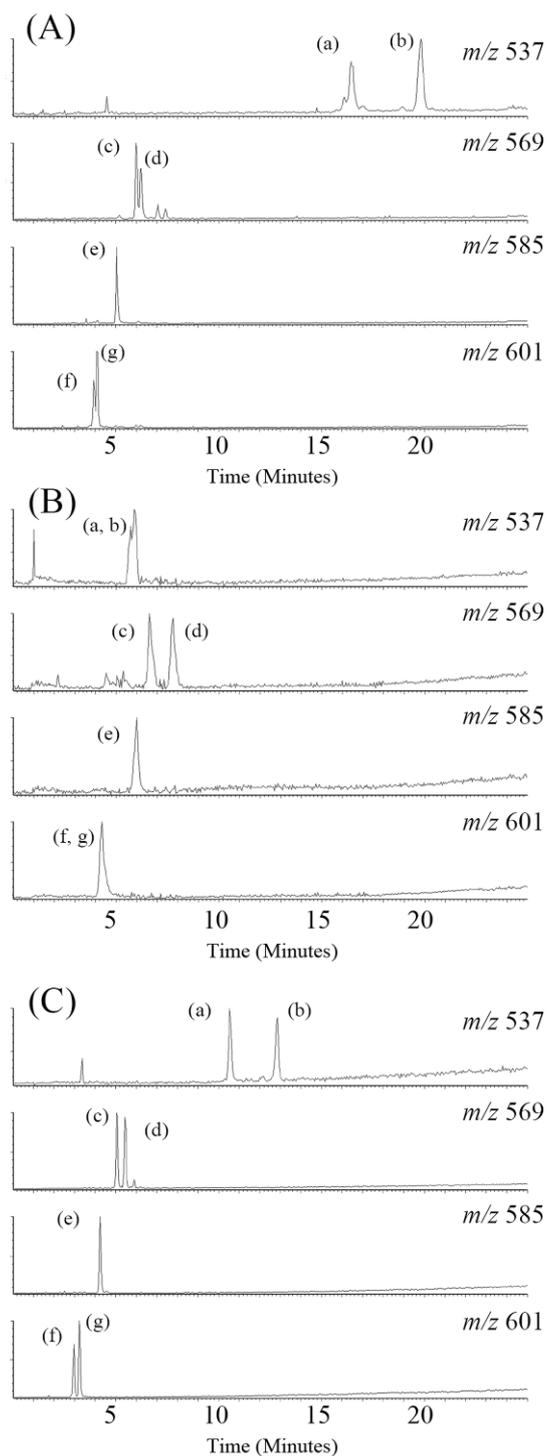


図 2-3 (A) モノメリック ODS カラム (Inertsil ODS3) , (B) ポリメリック ODS column (Inertsil ODS-P) , (C) モノメリック ODS カラム (Hibar Puroshere STAR RP-18e) を用いて、標品分析により得られたマスクロマトグラム. カラム以外の分析条件は Table 1-2, 1-3 に示した. 測定化合物(a)リコペン, (b) ベータカロテン, (c) ルテイン, (d) ゼアキサンチン, (e) アンテラキサンチン, (f) ネオキサンチン, (g) ビオラキサンチン

2-3-3. モノリスカラムの適用

次に、さらなる高分離分析を実現するために、SFC でベータカロテンの異性体分離に有効であることが報告されている²³、C18 修飾モノリス型シリカカラムである Chromolith® RP-18e の適用を試みた。モディファイヤーとして先ほどと同じくギ酸アンモニウム添加メタノールを用いて、グラジエント条件を検討した。まず、これまでと同様に開始時の 0.1% (w/v) ギ酸アンモニウムメタノールの割合 10%とし、分析を試みたが、カロテノイド類はほとんど保持されず、同時に溶出した。この原因としては、カラム長の短いカラムを用いたことに加え、モノリスカラムが持つ空隙率が 80%以上と一般的な粒子充填型カラムの 60-65%よりも高いため、カロテノイドとカラム固定相の相互作用が弱かったためであると考えられる。低いモディファイヤー条件で構造異性体の分離が向上し、なおかつ 7 種のカロテノイドの混合物を 10 分以内に分離できた (図 2-4A)。このカラムの炭素含有率は 18% であり、通常の ODS と同程度であるにも関わらず、粒子充填型カラムと異なる溶出順を示した。一番極性の低いと考えられるリコペンやベータカロテンといったカロテン類が先に溶出し、残りのカロテノイドは通常の逆相モードと同じというユニークな溶出順であった。逆相カラムを用いた場合の溶離挙動は、疎水性相互作用、水素結合性および立体選択性の主に 3 つの因子により影響を受ける。通常、逆相クロマトグラフィーにおいて主な化合物-カラム間の相互作用は疎水性相互作用であるため、極性の高い化合物から順番に溶出される。しかし、今回の分析では、強い水素結合性相互作用を生じる水酸基を持たないベータカロテンとリコペンが一番早く溶出したことから、水素結合性が保持挙動に大きく影響を与えていることが示唆された。このことは粒子充填型カラムにおいてビオラキサンチン (分子内に 2 つの水酸基を有する) よりも早く溶出されていたネオキサンチン (分子内に 3 つの水酸基を有する) がモノリスカラムを用いて分離した際には遅く溶出されることとからも推察される。既に述べたとおり、Lesellier らは逆相カラムの固定相の特性解析をカロテノイドを分離することにより行なっている⁷⁶⁻⁷⁹。その報告の中で Chromolith®RP-18e は比較的

ゼアキサンチンとベータカロテンの分離度が低い, すなわち, 水素結合性相互作用が強いカラムであることが示されている.

さらにこの場合の注入口圧力は 16.0 MPa と低かったため, 高流速での分析を試みた (図 2-4B). 高流速分析時においても注入口圧力は比較的 low に保たれ, 流速 5 ml/min で 18 MPa, 7 ml/min で 21 MPa と, それぞれ粒子径 5 μm , 3 μm の粒子充填型カラム (4.6 mm x 250 mm) を 3 ml/min で用いるのと同程度の圧力であった. 9 ml/min で分析した際にもネオキサンチンとビオラキサンチンの分離度が 2.62 と十分であり, なおかつ, 分析時間は 4 分とさらに短縮され, 高速分離が可能であることが示された.

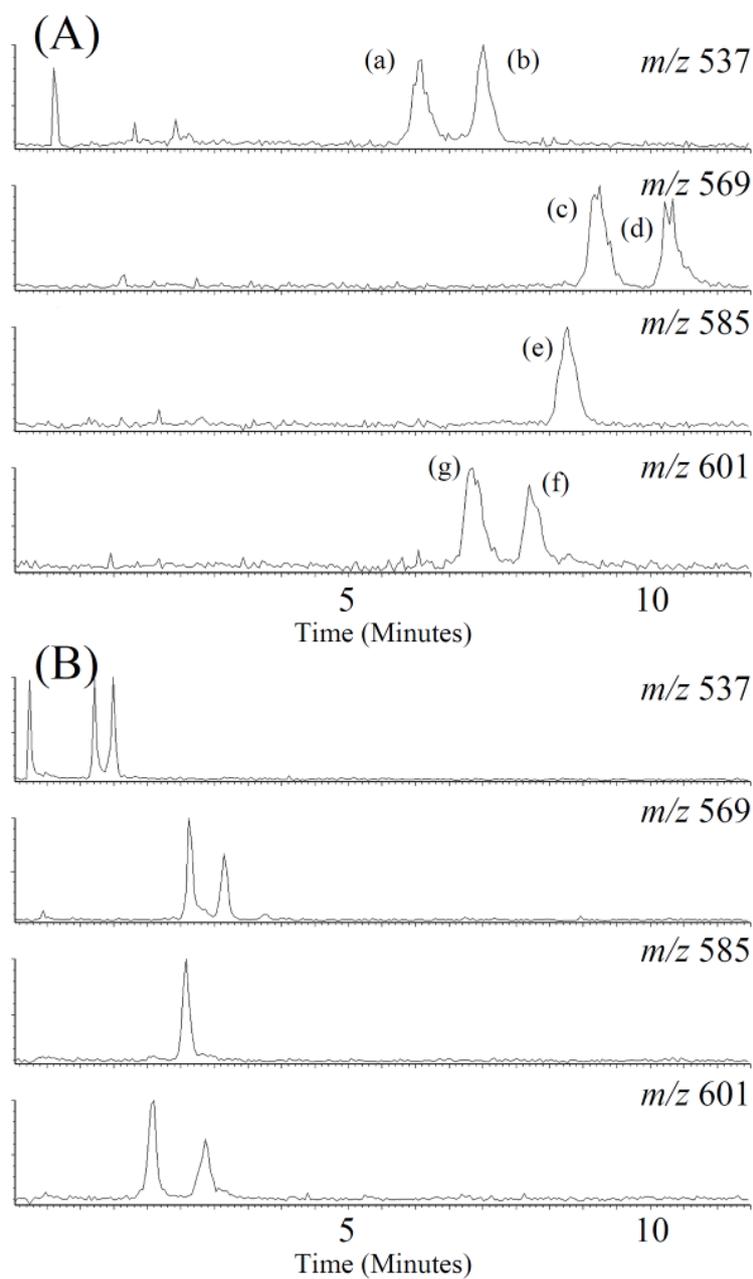


図 2-4 モノリス型 ODS カラム (Chromolith®) を用いて、流速 (A) 3 ml/min, (B) 9 ml/min で、標品分析により得られたマスキロマトグラム。Table 1-3 からモディファイヤーグラジエントを 1-5% 8 min に変更して分析を行った。(a)リコペン, (b) ベータカロテン, (c) ルテイン, (d) ゼアキサンチン, (e) アンテラキサンチン, (f) ネオキサンチン, (g) ビオラキサンチン

2-3-4. 検出下限値

流速を 3 ml/min として構築した分析系の感度を調べたところ、各カロテノイドの検出限界 (S/N> 3) はそれぞれ、リコペン (68 fmol) , ベータカロテン (64 fmol) , ルテイン (97 fmol) , ゼアキサンチン (85 fmol) , アンテラキサンチン (64 fmol) , ネオキサンチン (74 fmol) , ビオラキサンチン (73 fmol) であった。質量分析計を検出器として利用することで、UV-Vis 検出と比較して選択性だけでなく、感度も向上していることが分かった [21] (表 2-4)。また、報告されている APCI 法および ESI 法を用いた LC/MS の検出下限値よりもワンオーダー以上低い検出下限値を達成した。SFC/MS による検出感度が LC/MS と比較して高かったのは、上述の通り、ESI に適した溶媒条件で分析を行なうことができているためであると考えられる。

表 2-4 各種分析法によるカロテノイド類の検出下限値の比較

装置	検出限界 (fmol)	溶媒	文献
LC-DAD	2000	AcCN/MeOH/CH ₂ Cl ₂	T. H. Kao et al. (2011) ⁸⁶
LC-MS (APCI)	1000	MeOH/MTBE	T. Lacker et al. (1999) ⁶⁸
LC-MS (ESI)	900	AcCN/MeOH/CH ₂ Cl ₂	M. Carei et al. (1999) ⁶⁹
SFC-MS (ESI)	64	SCCO ₂ /MeOH	A. Matsubara et al. (2009)
SFC-MS/MS (ESI)	0.093	SCCO ₂ /MeOH	A. Matsubara et al. (2012)

2-3-5. モノリスカラムの連結による高分離の分析系の構築

次に、このシステムの生体試料分析における実用性を検証するため、*C. reinhardtii* のアセトン抽出物の分析を行った。特別な前処理はしていないため、抽出物には脂質やクロロフィルなどのさまざまな脂溶性夾雑物が含まれると予想された。さらに、ターゲットと構造類似性の高いカロテノイド類が含まれている可能性も高い。このようなサンプルを分析する場合には、標品の分離は達成されていても、それらのマトリックス成分により正確な同定および定量は非常に困難であると考えられた。実際、モノリスカラムを用いて構築した上記分析系 (flow rate: 3 ml/min) で分析を行ったところ、目的化合物以外のピークがマスククロマトグラム上に検出され、一部が目的カロテノイドのピークと重なった (図 2-5A)。そこで、モノリスカラムの低背圧という特長を利用し、カラムを連結することで分離の改善を試みた。三本のカラムを連結することで、同時に溶出していたピークを分離することに成功した (図 2-5B)。例えば、一本のカラムを用いたとき、ネオキササンチンと、保持時間 7.2 分 (m/z 601) の分離度は 0.9 だったが、三本のカラムを用いると 1.8 にまで分離が向上した。結果として多くの夾雑物を含む *C. reinhardtii* のアセトン抽出物から微量カロテノイドを含む 6 種のカロテノイドを十分な分離をもって検出できたことから、構築した分析系の実用性を示すことができた。

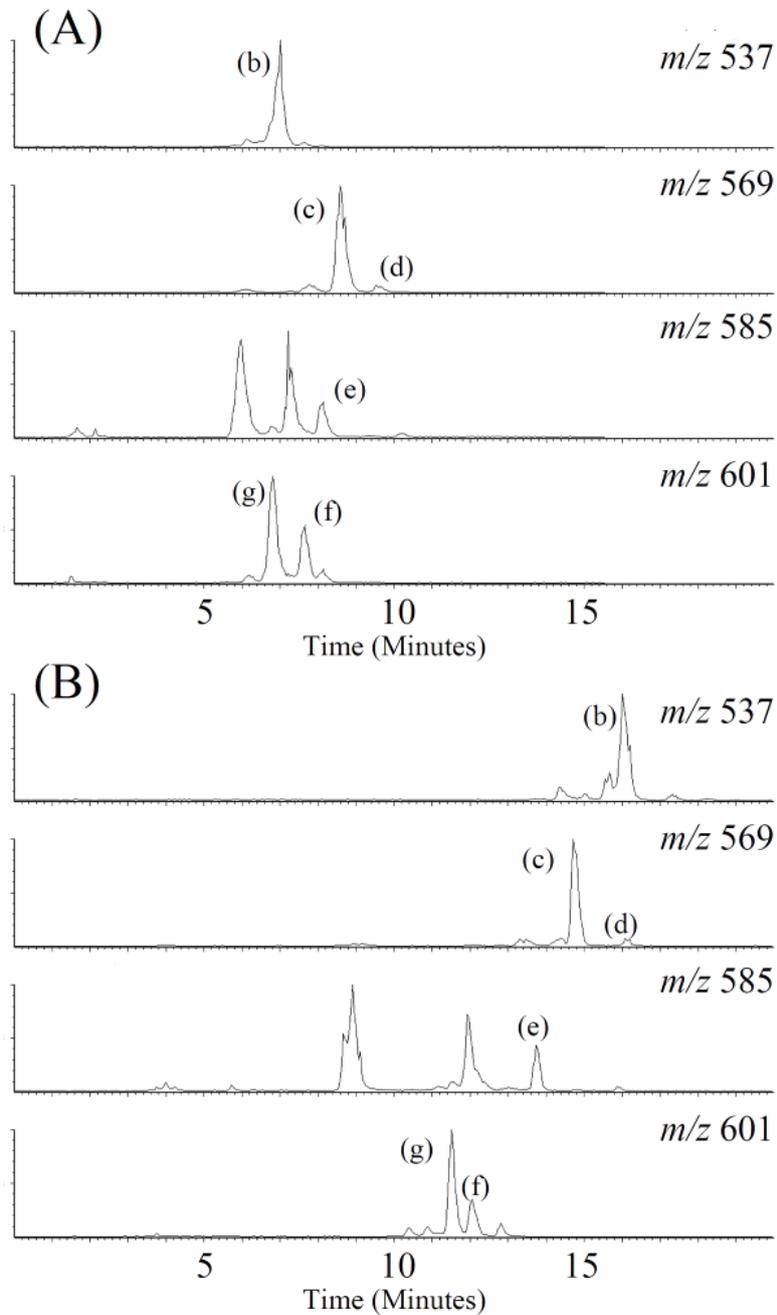


図 2-5 (A) 一本, (B) 三本のモノリス型 ODS カラム (Chromolith®) を用いて, 流速 3 ml/min で, *C. reinhardtii* のアセトン抽出物の分析により得られたマスクロマトグラム.

それ以外の分析条件は Fig. 1-4 と同じ条件で行った. (a) リコペン, (b) ベータカロテン, (c) ルテイン, (d) ゼアキサンチン, (e) アンテラキサンチン, (f) ネオキサンチン, (g) ビオラキサンチン

2-3-6. *C. reinhardtii* の各種環境ストレス条件下における代謝変動解析

C. reinhardtii は真核細胞の光合成独立栄養生物である。ゲノムが解読されており、光合成生物の基本的な代謝に関するモデル生物として広く利用されている⁸⁷。本章で構築した SFC/MS によるカロテノイド分析系の実用性を検証するため、*C. reinhardtii* における各種環境ストレスに対するカロテノイド代謝経路の応答を調べた。

浸透圧、酸化、塩ストレスとして、それぞれソルビトール 0.4 M、パラコート 100 nM、塩化ナトリウム 0.1 M を用いたストレス条件下において培養した *C. reinhardtii* のアセトン抽出物を SFC/MS に供した (図 2-6) ところ、他のストレス処理群とコントロール群においてはカロテノイド含量に顕著な差が認められなかったが、酸化ストレス処理群ではストレス負荷処理 1.5 時間から 6 時間後にかけてゼアキササンチンおよびアンテラキササンチンの蓄積、および他のカロテノイドの経時的減少を認めた。クロロフィル a,b を光合成色素として有する高等植物や *C. reinhardtii* を含む藻類において、光合成系の障害がピオラキササンチンからアンテラキササンチンおよびゼアキササンチンへの変換を誘導し、余剰のエネルギーを熱として放出することでさらなる光合成系の障害を防止する機構、キサントフィルサイクルが存在することが知られている^{25,26}。他のストレスと比較し、光化学系に対する毒性が強いと考えられるパラコート特異的にこれらのカロテノイドの含量上昇を認めたことからキサントフィルサイクルが機能していることが示唆された。一方、6 時間後以降、ゼアキササンチンおよびアンテラキササンチンを含む多くのカロテノイド濃度がパラコート添加群で減少している。同濃度でパラコートを添加した以前の報告において、6 時間後以降光合成活性の低下が認められていること⁸⁸ から、過度の酸化ストレスによりキサントフィルサイクルによる光化学系の障害抑制機構が破綻し、光合成関連色素の分解が起こっていることが示唆された。このことから、細胞内において起こるストレス応答反応により生じるカロテノイド類の代謝変動を捉えることができた当該分析系は、実試料分析においても有用であることが示された。

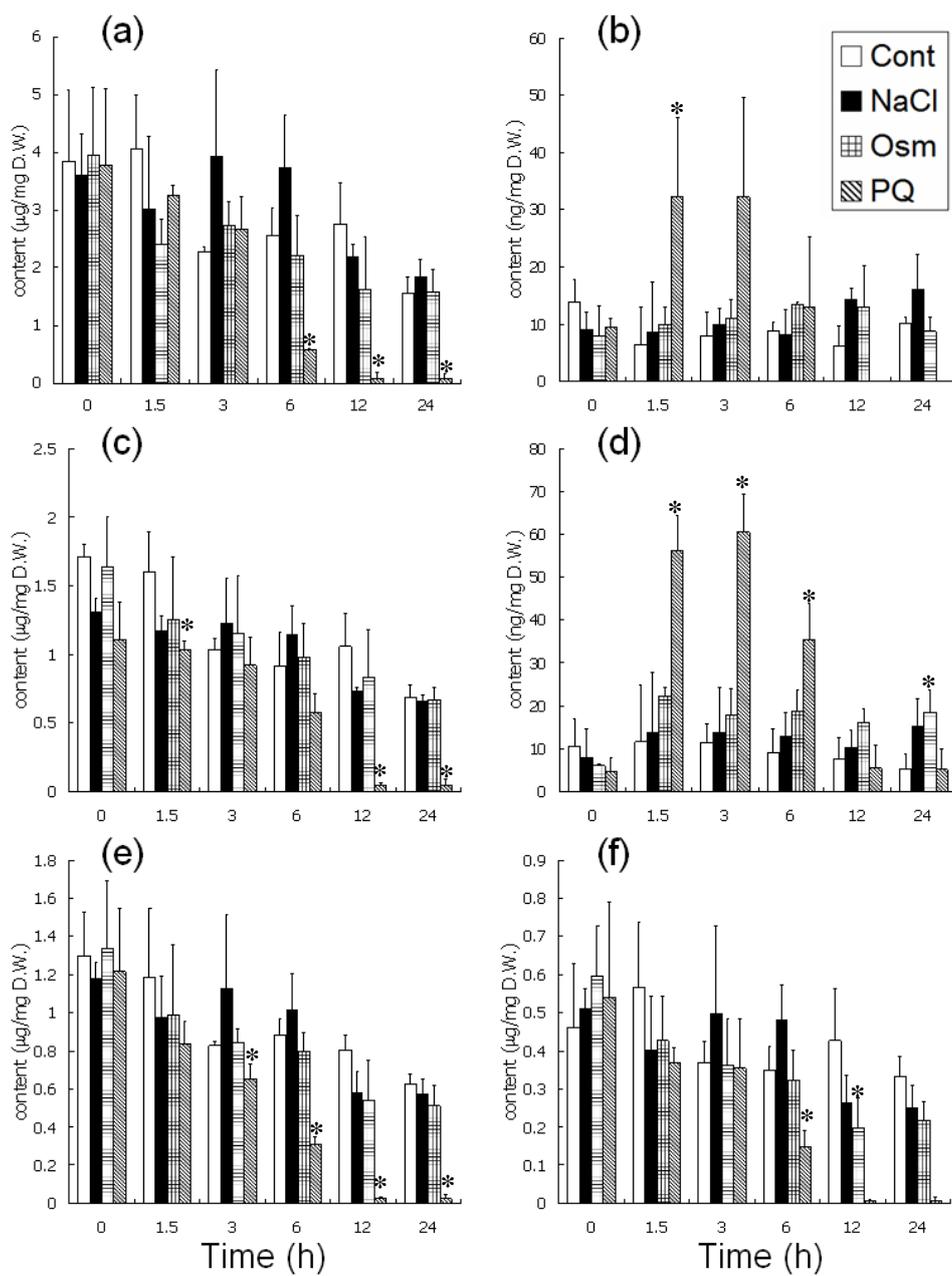


図2-6 各ストレス条件下における *C. reinhardtii* に含まれるカロテノイド類の代謝変動解析。塩、浸透圧、酸化ストレスはそれぞれ 0.1 M NaCl (NaCl), 0.4 M ソルビトール(Osm), 100 nM パラコート (PQ) を処理することで負荷した。Cont はコントロールを指す。Time はストレス処理後の経過時間を示している。値は 3 回実験を行った際の平均値±標準偏差を示す。(a) ベータカロテン, (b) ゼアキササンチン, (c) ルテイン, (d) アンテラキササンチン, (e) ビオラキササンチン, (f) ネオキササンチン *p<0.05 vs. Cont.

表 2-5 カロテノイド分析系の比較.

装置	分析時間 (分)	検出限界 (fmol)	溶媒	文献
LC-DAD	55	2000	AcCN/MeOH/CH ₂ Cl ₂	T. H. Kao et al. (2011) ⁸⁶
LC-MS(APCI)	30*	1000	MeOH/MTBE	T. Lacker et al. (1999) ⁶⁸
LC-MS(ESI)	40*	900	AcCN/MeOH/CH ₂ Cl ₂	M. Carei et al. (1999) ⁶⁹
SFC-MS (ESI)	20	64	SCCO ₂ /MeOH	A. Matsubara et al. (2009)
SFC-MS/MS(ESI)	20	0.093	SCCO ₂ /MeOH	A. Matsubara et al. (2012)

*ルテインとゼアキサントンの分離は行われていない

2-4. 考察

本章では SFC/MS をカロテノイド分析に応用することで、その有用性について検証した (表 2-5)。

SFC/MS の従来法である LC/DAD および LC/MS に対するアドバンテージの一つは、分離能およびスループットの向上である。構造異性体を含むカロテノイドの分離において SFC は高い分離能を示した。SFC では、LC においてカロテノイド分離に最適とされる C30 カラムを用いることなく、通常の ODS カラムを用いることで構造異性体を含む 7 種のカロテノイドを 20 分以内に分離できた。これは、SF が液体に比べて拡散性が高いため、HPLC と比較して高速の分離が可能であることを合わせて、水素結合性相互作用や立体選択性などの疎水性相互作用以外の相互作用の影響も強く受けることも要因の一つであると考えられる。このことはエンドキャッピング様式の異なるカラムで分離挙動が変化したこと (図 2-3) や Chromolith を用いた際に認められた大きな水素結合性相互作用 (図 2-4) から推察される。このことは、以前の SFC の分離特性解析の結果と矛盾しない(未発表データ)。その報告では、修飾様式 (ポリメリック, モノメリック) およびエンドキャッピング処理 (有り, 無し) の異なる C30 修飾シリカ充填カラムを用い、各種カラム性能を HPLC および SFC で評価、比較することで SFC の分離特性が解析された。トリフェニレンおよびオルトテルフェニルを用いた評価の結果、SFC が HPLC に比べ 2 倍以上の立体選択性を有することが明らかとなった。また、カフェインとベンゼンを用いることで水素結合性認識能が比較された結果、エンドキャッピングの有無による分離係数の差が SFC において HPLC よりも顕著に現れたことから、残存シラノール基による水素結合性認識能が強いこと示唆された。これらの報告と本研究の結果を合わせて考察すると、SF の高い拡散性により、疎水性基以外の固定相の化学的構造に由来する分離モードの影響が出やすいことが示唆された。これらの分離モードを効果的に開発、利用することにより、SFC のパフォーマンスを最大限に発揮されるようになることが期待される。

また、SFC/MS の適用のもう一つのアドバンテージは感度の向上である。LC/MS では、使用する移動相によっては MS におけるイオン化効率が低下し、その場合感度が低下する。実際 LC/MS がカロテノイド分析に応用された場合、非極性溶媒が移動相として用いられるため感度が低下し、検出下限値は約 1 pmol (表 2-4) である。検出感度の低下は微量カロテノイドの検出や、小スケールでのカロテノイド分析を行なう際の障害となる。一方、イオン化可能な溶媒を移動相とすると、分離が制限される。特に高脂溶性代謝物を逆相 HPLC で分離する場合、メタノールやアセトニトリルなどの MS に適した極性の高い溶媒を用いると、高い疎水性を持つカラムの固定相との相互作用が、溶媒による溶出力に勝るため、対象化合物を溶離することが困難となる。しかし、逆相カラムを用いた脂溶性代謝物の分析は、特に構造類似性の高い脂溶性代謝物を分離するための重要な分析手法である。微量成分の多成分一斉分析を行なうためには質量分析との接続が必須となるため、移動相とイオン化効率の問題は脂溶性代謝物プロファイリングにおいて大きな障害となっている。SFC/MS では逆相カラムを用いた場合でも、メタノールによる疎水性代謝物の溶出ができるため、この問題を回避できる。実際、当該研究において構築した分析系は、LC/MS の十分の一以下である数十 fmol オーダーでのカロテノイド類の検出を可能にしている(表 2-4)。

さらに、モノリスカラムを SFC に応用することで、実用的な分析システムを構築できることを明らかにした。このことは LC の高性能化に用いられる技術が SFC にも応用可能であることを示している。モノリスカラムは低背圧で高効率という特徴を持つため、SFC においても、LC において行われているような長いキャピラリーモノリスカラムによる超高理論段分析の実現が期待される。近年では、高圧送液と粒子径 2 μm 以下のカラムを用いることにより、SFC でも UPLC (ultra-performance liquid chromatography) と同様の高速・高理論段を実現可能な装置が市販されている。今後このような高性能化技術が SFC にも応用され、クロマトグラフィー技術としての優れたパフォーマンスを示すことが SFC を代謝物分析技術として一般化させる上では重要な検討課題であると考えられる。

構築した分析系を緑藻 *C. reinhardtii* に適用することで、環境ストレス応答反応におけるカロテノイド類の代謝変動を捉えることができた。*C. reinhardtii* の主要なカロテノイドであるルテインと異性体の関係にあり、その存在量が 100 分の 1 程度であるゼアキサンチンが酸化ストレス特異的に変動していることを少量のサンプルを分析することにより見出すことができたことから、本分析系の実用性を示すことができた。

以上より、SFC/MS がカロテノイド分析において有用な分析技術であることを示すことができた。MS における検出感度を損なうことなく、高い分離能を持って短時間で異性体を含むカロテノイドを分離分析できる SFC/MS は、臨床検体などの小スケールサンプルの多検体スクリーニング分析において有用な戦略یであると考えられる。

第三章 超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析を用いたカロテノイドエポキシド分析系の構築

3-1. 緒言

C40 のイソプレノイドであるカロテノイドは、自然界の色彩を司り、植物で光捕集という光合成において重要な役割を果たしている。一方で、動物においても視覚に深く関与していることが報告されている⁵⁰。さらに、カロテノイドは脂溶性の抗酸化物質として、膜成分の酸化から保護する。酸化ストレスがさまざまな疾患と関係していると言われていた昨今²⁶⁻²⁸、カロテノイドのこの機能が注目され、カロテノイドがヒトにおいて果たす役割について調べられるようになった。これまでにカロテノイドの摂取量や血中濃度と疾病の罹患率や予後を大規模な集団において調べることにより行われた観察的疫学研究により、カロテノイドの摂取量や血中カロテノイド濃度と冠動脈疾患や脳血管障害などのさまざまな酸化ストレス疾患のリスクとの間に負の相関があることが報告されている²⁸⁻³⁰。しかし、被験者にカロテノイドを含むサプリメントを摂取させることにより行われた介入試験の結果は観察的疫学試験から予想される結果とは異なっていた。喫煙者やアスベスト作業従事者などの酸化ストレス曝露者において、カロテノイドが肺がんや冠動脈疾患による死亡率を上昇させることが明らかになった^{89,90}。このことは血中カロテノイドを測定するだけで、これらの疾患のリスクを評価することは困難であることを示唆している。さらに、カロテノイドはヒトの体内で生合成できないため、専ら外部からの吸収に頼っているおり、食習慣に大きな影響を受ける血中カロテノイド濃度を測定することで、疾患リスクを評価することは困難であると考えられる。

一方、カロテノイドは、物理化学的なストレスによりシス体、カロテノイド酸化開裂物、カロテノイドエポキシドなどのさまざまな誘導体を生成することが知られている^{91,92}。これ

らの酸化生成物が酸化ストレス曝露者へのカロテノイド投与による発がん促進作用に寄与しているのではないかと考えられ、いくつかの研究が行われた。その結果は、カロテノイド酸化生成物が DNA ダメージ促進作用を有していることを示唆している^{93,94}。Salgo らの研究では、カロテノイドエポキシドを含む HPLC フラクシオンが benzo[a]pyrene の DNA への結合を促進することが明らかになった⁹⁴。それゆえカロテノイド本体だけでなく、酸化生成物であるカロテノイドエポキシドも含めてプロファイリングすることがカロテノイドの疾患における機能を調べるためには重要であると考えられる。また、カロテノイドはヒトの体内で生合成できないため、専ら外部からの吸収に頼っている。よって血清中のカロテノイドレベルの低下がカロテノイド消費量の上昇により生じたものか、それともカロテノイド供給量の不足、すなわち食餌からの摂取量が不足していることで生じているのか判断することができない。酸化ストレスの存在の直接的な証拠となりうるカロテノイドエポキシドやそのカロテノイド中の存在比は、食餌による影響を大きく受けるカロテノイド本体よりも有用なバイオマーカーとなりうる。酸化ストレスの直接の証明となるこれらの物質を測定することは、体内で生じている酸化ストレスを、食餌や吸収などの個人差を補正して評価するのに有用であると考えられる。しかしながら、これらの誘導体は微量であることから検出が難しい。またカロテノイドエポキシドは、体内に多く存在するカロテノイドヒドロキシド、すなわち、ベータクリプトキサンチンなどのキサントフィルと異性体に当たるため、これらの分子を分離し、正確に検出することは難しい。これまで、フォトダイオードアレイ検出器を用いて吸収極大をモニターすることで、これらの分子の分析が試みられてきたが、フォトダイオードアレイ検出器は感度が低いことから、ヒト保存血清などの微量のサンプルに適用することは困難であると考えられる。

第二章において、SFC/MS がカロテノイド分析において有用な分析技術であることを示した。SFC/MS が示す高い分離能および検出感度は、さまざまな類縁体を含む生体試料からの微量なカロテノイド類の検出に力を発揮すると考えられる。さらに本章では、より選

択的にカロテノイドエポキシドを検出するために、三連四重極型 (triple- quadrupole: QqQ) MS を検出器として採用した。QqQ-MS を用いることにより、 m/z に加えて衝突誘起解離により生じるフラグメントパターン情報も用いることでより選択的な検出を行なうことができる。本章では SFC/MS の効果的な応用例として、カロテノイドおよびそのエポキシ体の一斉分析システムを構築した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

SFC の移動相に用いた二酸化炭素（純度 99.9%）はネリキガスから購入した。モディファイヤーとして用いた HPLC グレードのメタノールは和光純薬から、添加剤として用いたギ酸アンモニウムはシグマアルドリッチから購入した。カロテノイドの標準品はそれぞれ以下に示すメーカーから購入した：ベータカロテン, Nacalai Tesque (Kyoto, Japan); アルファカロテンとベータクリプトキサンチン, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan); ゼアキサンチン, Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Ontario, Canada); ルテイン, ChromaDex, Inc. (Irvine, CA, USA).

3-2-2. 装置

SFC 装置は Thar Method Station (Waters, Milford, MA, USA)を用いた。本章では二種類の三連四重極型質量分析計を用いた。直接導入法によるフラグメントパターン取得は AB Sciex 社の QTRAP5500 の Enhanced product ion scan モードにより行った。Multiple reaction monitoring (MRM) には Waters 社の Xevo TQ を用いた (図 3-1)。



図 3-1 本章で用いた分析機器
上から順に Thar Method Station,
QTRAP5500, Xevo TQ

3-2-3. 分析条件

共通する分析条件について、SFCは表3-1に、QTRAP5500およびXevoTQについてはそれぞれ表3-2および3-3に示した。その他の分析条件については本文や図の説明文に示した。

表 3-1 分析条件 (SFC)

outlet pressure	10 MPa
column temperature	35 °C
mobile phase	SCCO ₂
modifier	methanol with 0.1% ammonium formate
flow rate	3 ml/min

表 3-2 分析条件 (QTRAP5500)

polarity	positive
ion spray voltage	5.5 kV
curtain gas	20 psi
ion source gas 1	0 psi
ion source gas 2	0 psi
entrance potential	10 V
collision energy	23 V

表 3-3 分析条件 (Xevo TQ)

polarity	positive
capillary voltage	2.5 kV
cone voltage	30 V
collision energy	15 V
desolvation temperature	600°C
desolvation gas	800 l/h
cone gas	60 l/h
source temperature	150°C

3-2-4. カラム

本章で用いたカラム (内径: 250 mm × 4.6 mm, 粒子径: 5 μm) は以下の通りである。YMC-Pack Silica (YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan), Inertsil Ph-3 (GL Sciences, Tokyo, Japan), YMC Carotenoid (YMC Co., Ltd.), and Merck Purosphere RP-18e (Merck, Darmstadt, Germany)

3-2-5. カロテノイドのエポキシ化

カロテノイドのエポキシ体の標品は市販されていないため、文献の方法にしたがって調製した⁹⁵。まず 50 μl の 1 mg/ml カロテノイドクロロホルム溶液を窒素ガスにより乾燥し、0.5 ml の 0.1 mg/ml *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) のジエチルエーテル溶液を添加した。室温で 2 時間反応させ、1 ml の 5 g/l 水酸化ナトリウム溶液を添加することで反応を終了させた。1 ml の蒸留水による洗浄後、ジエチルエーテル層を回収し、窒素ガスにより乾固した。残渣を 1 ml のクロロホルムに再溶解し、適宜希釈 (直接導入法: メタノールにより 10 倍希釈, MRM: クロロホルムにより 100 倍希釈) し分析に供した。

3-2-6. 血清および低密度リポタンパク質からのカロテノイド抽出液の調製

血清サンプルは大阪大学の学生 8 人より採取された、また、低密度リポタンパク質 (low-density lipoprotein: LDL) は神戸大学の研究員の血清から精製されたものを用いた。カロテノイドは文献の方法にしたがって抽出された⁹⁶。まず、0.1 ml のサンプル (血清および 25 mg protein/ml LDL 溶液) に 0.1 ml の蒸留水、内部標準物質として 10 ng/ml の echinenone を含む 0.2 ml のエタノールおよび 5 μg/ml dibutylhydroxytoluene のヘプタン溶液を 1 ml 添加し、ヘプタン層を窒素気流下で乾固した。残渣を 0.1 ml のヘキサンにより再溶解し、SFC/MS/MS に供した。

3-3. 結果

3-3-1. 検出条件の検討

まず、インフュージョン分析により、ベータカロテンのイオン化条件を検討した。一方、ESIによるイオン化を試みたところ、以前の報告の通り、ベータカロテンはESIによって良好にイオン化され、主なプロダクトイオンとして[M-92]⁺を与えた。これはカロテノイドの構造内のポリエン部より、トルエンが脱離することで生じると考えられている。

エポキシカロテノイドの標品は商業的に利用不可能だったため、エポキシ化試薬である*m*CPBAを用い、カロテノイドをエポキシ化することで作成した。作成したサンプルを直接導入法により、質量分析に供し、エポキシカロテノイドのイオン化条件を検討した。第三章第二節でも述べたとおり、ここでは質量分析計として、ハイブリッドトリプル四重極・リニアイオントラップ型質量分析計であるQTRAP5500をenhanced mass scan (EMS) および enhanced product ion scan (EPI) モードで用いた。これらの分析モードでは、Q3がリニアイオントラップとして用いられることで、MS スキャンおよびプロダクトイオンスキャンの感度を大幅に向上させることができる。調製したサンプルを分析したところ、ベータカロテン (C₄₀H₅₆, *m/z* 536) に加え、新たに *m/z* 552 が検出された(Fig. 1a)。これはベータカロテンに酸素原子が一つ付加した C₄₀H₅₆O の組成式を持つことが予想された。構造を推定するため *m/z* 552 のプロダクトイオンスキャンを行ったところ、カロテノイドに共通して検出される[M-92]⁺に加え、[M-80]⁺が検出された(Fig. 1b)。環状の C₆H₈ が脱離することによりエポキシカロテノイドより[M-80]⁺が生成されることが FAB-CID-MS/MS によるこれまでに報告されている⁹⁷ため、この分子がエポキシベータカロテンであることが強く示唆された。

一方、カロテノイドのイオン化に ESI よりも高い頻度で用いられる APCI 法を適用したところ、偽分子イオンとして[M+H]⁺が得られた。このイオンに対し、プロダクトイオンスキャンを行ったところ、ポリエン部由来と考えられる低 *m/z* 領域の繰り返しパターンの中

ロダクトイオンが得られるものの、 $[M-92]^+$ や $[M-80]^+$ といった構造特異的なイオンは検出されなかった。APCIではなく、ESIを採用し、これらの構造特異的なニュートラルロスターゲットとして分析を行なうことで、カロテノイドの構造を高感度に特徴づける可能性が示唆された。

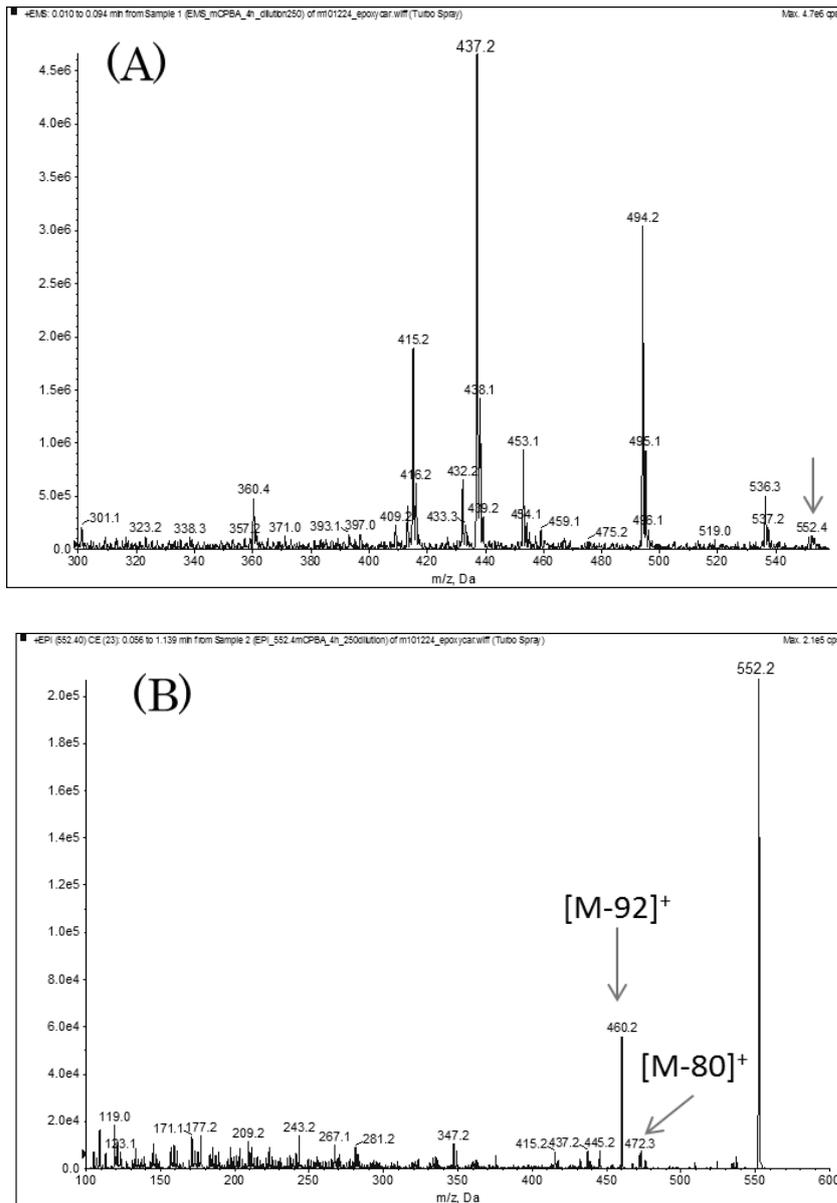


図 3-2 β -carotene の *m*CPBA 反応物の分析により得られたスペクトラム

(A) MS スキャン, (B) プリカーサーイオン m/z 552 のプロダクトスキャン

3-3-2. 分離条件の検討

次に、分離条件を検討した。正確な分析のためには、異性体が分離されている必要がある。そこで、先ほどの手法で調製したエポキシベータカロテンと、その異性体であるベータクリプトキサンチン (β,β -carotene-3-ol) の標準品を用い、分離条件を検討した。

各化合物の検出には MS/MS の分析モードの一つである multiple reaction monitoring (MRM) を用いた。MRM は化合物に特異的なプリカーサーイオンおよびプロダクトイオンの組み合わせを用いることで高い選択性および感度を持って検出する手法である。ベータクリプトキサンチンとエポキシベータカロテンは同じ組成式 ($C_{40}H_{56}O$) を有する異性体の関係にあるが、エポキシベータカロテンのプロダクトイオンである $[M-80]^+$ はベータクリプトキサンチンからは観測されない。エポキシベータカロテン特異的な MRM トランジション $552>472$ をモニターすることにより、エポキシベータカロテンを選択的に検出することができる。以後の分析に用いた MRM トランジションは表 3-4 に示した。

以前の報告と同様に、順相系固定相として用いられるシリカカラムでは保持されず、各カロテノイドは分離されなかった (図 3-3A, 2-3-2 参照)。次に π - π 相互作用を期待して固定相に π 電子を有するフェニルカラムを適用した。しかし、ブロードなリーディングピークが観測され、分離もされなかった (図 3-3B)。今回用いた Inertsil Ph-3 カラムはエンドキャッピングが施されていないことから、シラノール基の影響を強く受け、ピーク形状が悪かった可能性がある。次に、HPLC 分析において代表的なカロテノイド分析用のカラムである C30 カラムを用いた。すると、各カロテノイドが良好に分離され、さらにベータカロテン ($536>444$) の MRM クロマトグラム上にベータカロテンよりも早く溶出する 2 本のピークが検出された (図 3-3C)。逆相カラムを用いた場合、ベータカロテンよりも高い極性を持つエポキシベータカロテンは、ベータカロテンよりも早く溶出すると考えられる。さらに以前の報告で、ベータカロテンのエポキシ化反応物には 5,6 および 5,8-epoxy 体の二種類の異性体が存在することが報告されていることから、これらのピークはそれらの 2 種類

の異性体に由来すると示唆された。さらに、以前の報告で良好な分離を示した ODS カラム (Merck Purospher RP-18e) で分析したところ、C30 カラムと同様にカロテノイドおよびその異性体を良好に分離できた (図 3-3D)。さらに分析時間は C30 カラムを用いた場合よりも短かった。

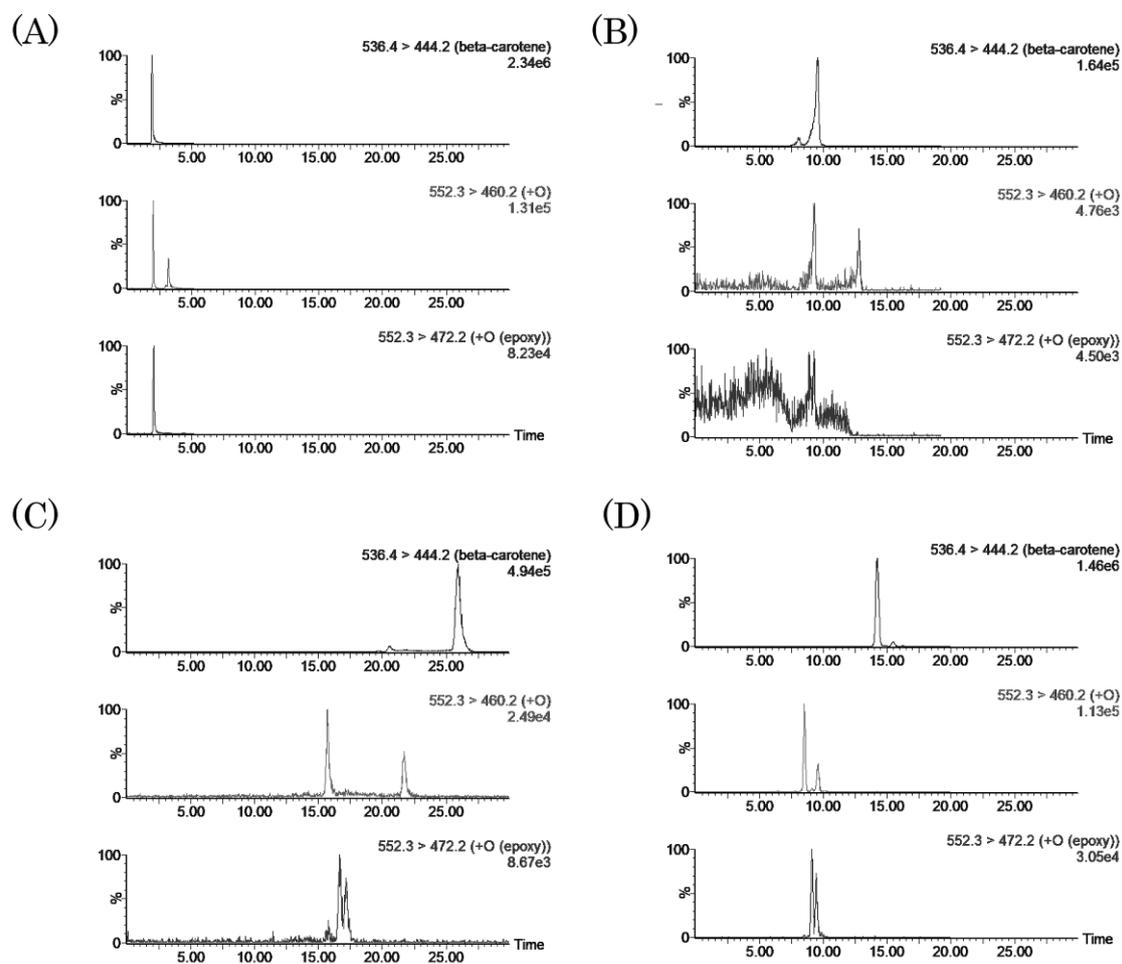


図 3-3 SFC/MS/MS による β -carotene エポキシ化反応物および β -cryptoxanthin の分析により得られた MRM クロマトグラム

(A) YMC-Pack Silica, (B) Inertsil Ph-3, (C) YMC Carotenoid および (D) Merck Puroshere RP-18e. 分析条件: outlet pressure, 10 MPa; column temperature, 35°C; flow rate, 3 ml/min; modifier, methanol with 0.1% ammonium formate 10-40% 30 min.

次に、ヒトが蓄積する主要なカロテノイド（アルファカロテン、ベータクリプトキサンチン、ルテイン、ゼアキサンチン）をエポキシ化し、ODS カラムにより分析した（図 3-4, 表 3-4）。それぞれの反応物を分析することで、対応するエポキシ体の MRM クロマトグラム上に数本のピークを検出した。さらにプロダクトイオンスキャンにより [M-92]⁺および [M-80]⁺を検出することを確認している。最終的にカロテノイドおよびそのエポキシ化物を 20 分で良好に分離できた。HPLC と C30 カラムを用いた場合、今回対象としたカロテノイドをすべて含む、カロテノイド類の一斉分析に 85 分という時間を要していた⁹⁸。高圧送液および粒子径の小さなカラムを用いることで分離効率およびスループットにおいて HPLC に勝るとされる ultra performance liquid chromatography (UPLC) を用いた場合でもルテインやいくつかの植物に含まれるエポキシカロテノイドを含む飼料中カロテノイドの分析に 40 分以上の時間を要し、さらに分析対象物の中にカロテン類のエポキシ化物は含まれていなかった⁹⁹。これらの結果は、カロテノイドや疎水性代謝物の分離に SFC が有用であることを改めて示している。

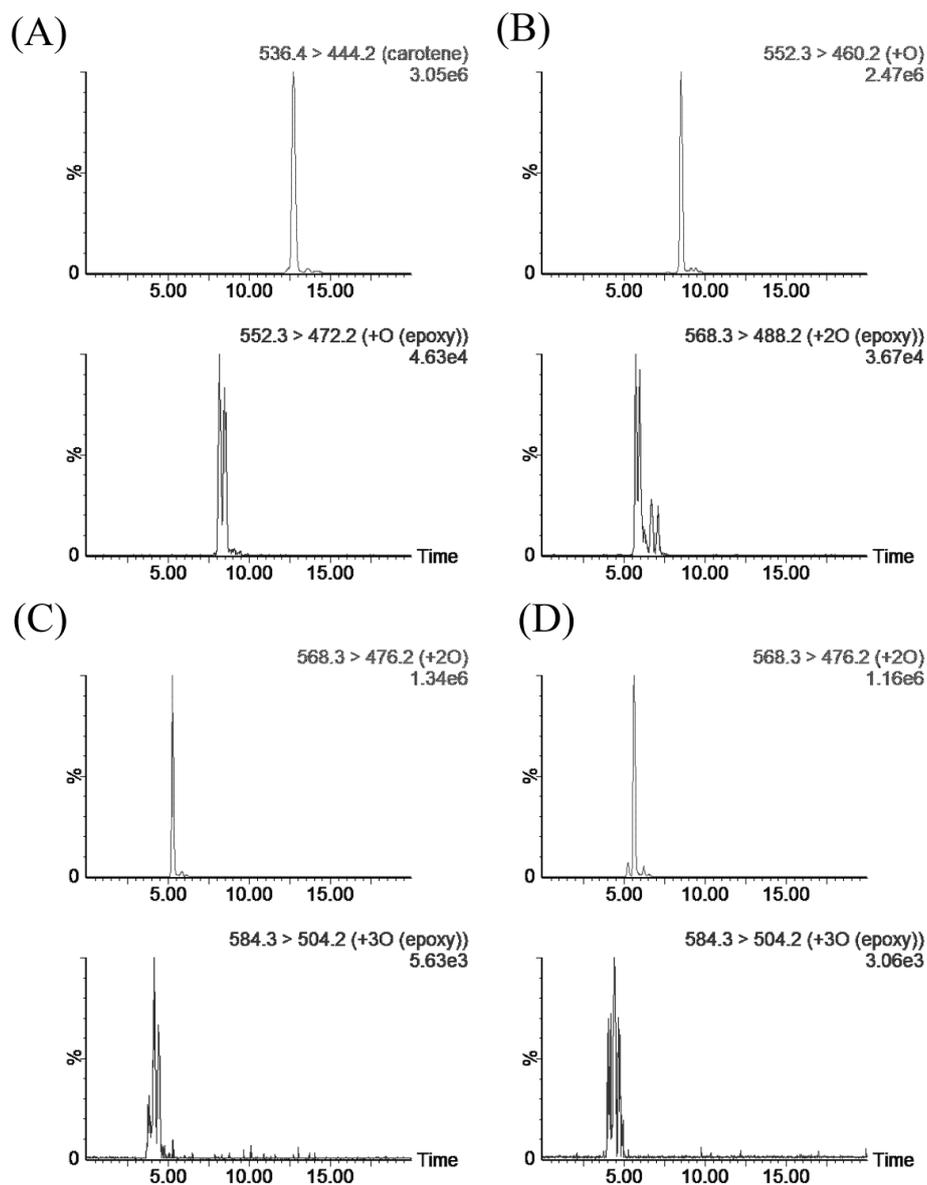


図 3-4 ODS カラムを用いた SFC/MS/MS による各種カロテノイド標準品エポキシ化反応物の分析により得られた MRM クロマトグラム

(A) α -carotene, (B) β -cryptoxanthin, (C) lutein and (D) zeaxanthin と *m*CPBA の反応物.
 分析条件: column, Merck Puroshere RP-18e; modifier, methanol with 0.1% ammonium formate 10–25% for 15 min, 25% for 2 min, 25–10% for 1 min, 10% for 2 min; その他の分析条件については図 3-3 に示した. 上段: 未反応物, 下段: 対応するエポキシ化体に特異的な MRM クロマトグラム.

次に、同じ分析条件でバリデーションテストを行った（表 3-4）。相対標準偏差（RSD : relative standard deviation）は全カロテノイドで保持時間において 0.6%以下、面積値において 10%以下で、良好な再現性を示した。また、構築した分析系は 3 桁以上の広いダイナミックレンジを有しており、存在比が大幅に異なるようなカロテノイドの分析においても正確にその量比を算出できると考えられる。さらに、当該分析系における各カロテノイドの検出下限値（ $S/N > 3$ ）は 0.2 fmol 以下であったことから、高感度な分析系であるといえる。第二章で構築した SFC/MS による分析系からさらに約 100 倍もの感度上昇を達成した。これは MRM により選択的に各分子を検出することでノイズを顕著に抑制し、 S/N 比が改善したからであると考えられる。第 2 章でも述べたとおり LC/MS を用いた場合、移動相に非極性溶媒を用いるためイオン化効率が低下する。実際、以前の報告で LC-MS/MS（APCI）を用いた場合の検出下限値は 11 fmol であった。このことは SFC/ESI-MS/MS がカロテノイドの高感度分析に有用であることを示している。

表 3-4 SFC/MS/MS によるカロテノイド分析系のバリデーション結果

#	carotenoid	^a MRM transition	retention time [min]	^b RSD [%]		correlation coefficient (R ²)
				retention time	area	
1	α-carotene	536.4>444.3	12.7	0.18	5.2	0.998
2	β-carotene	536.4>444.3	14.0	0.15	10	0.998
3	β-cryptoxanthin	552.4>460.3	8.6	0.18	3.8	0.993
4	^d epoxy-α-carotene_1	552.4>472.3	8.1	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
5	^d epoxy-α-carotene_2	552.4>472.3	8.4	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
6	^d epoxy-β-carotene_1	552.4>472.3	9.0	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
7	^d epoxy-β-carotene_2	552.4>472.3	9.4	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
8	lutein	568.4>476.3	5.3	0.11	4	0.997
9	zeaxanthin	568.4>476.3	5.7	0.51	2.5	0.996
10	^d epoxy-β-cryptoxanthin_1	568.4>488.3	6.0	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
11	^d epoxy-β-cryptoxanthin_2	568.4>488.3	6.7	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
12	^d epoxy-lutein	584.4>504.4	3.8	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.
13	^d epoxy-zeaxanthin	584.4>504.4	4.1	^e n.s.	^e n.s.	^e n.s.

#	carotenoid	linear range [fmol]	^c LOD [fmol]
1	α-carotene	0.19-930	0.19
2	β-carotene	0.47-930	0.093
3	β-cryptoxanthin	0.18-910	0.091
4	^d epoxy-α-carotene_1	^e n.s.	^e n.s.
5	^d epoxy-α-carotene_2	^e n.s.	^e n.s.
6	^d epoxy-β-carotene_1	^e n.s.	^e n.s.
7	^d epoxy-β-carotene_2	^e n.s.	^e n.s.
8	lutein	0.44-440	0.18
9	zeaxanthin	0.44-440	0.18
10	^d epoxy-β-cryptoxanthin_1	^e n.s.	^e n.s.
11	^d epoxy-β-cryptoxanthin_2	^e n.s.	^e n.s.
12	^d epoxy-lutein	^e n.s.	^e n.s.
13	^d epoxy-zeaxanthin	^e n.s.	^e n.s.

^aMRM 分析のためのプリカーサーイオン>プロダクトイオンのペア
^b1 fmol インジェクションにより得られた値より計算(n=3)

^cLOD: limit of detection (signal/noise>3)

^dEPI spectra に [M-92]⁺および [M-80]⁺が検出されることを確認した

^en.s.: not specified (LOD, 直線範囲, R²については商業利用が可能なカロテノイドについてのみ示した)

3-3-3 実サンプルへの適用

上記で構築したカロテノイドおよびそれらの酸化物のプロファイリングシステムの実サンプルでの検証を試みた。実サンプルにおいては夾雑物の存在により正確な同定が妨げられる可能性がある。実際、まず、健常者のヒト血清のヘプタン抽出物を分析したところ、MRM トランジション 552>460 にはベータクリプトキサンチン以外にも複数のピークが検出され、エポキシカロテノイド以外にも異性体が存在することが示唆された (図 3-5A)。このような場合でも、カロテノイドエポキシドに特異的なフラグメントイオンである [M-80]⁺ (552>472) をモニターすることで、より選択的にエポキシカロテノイドを検出できた。結果として、5 種類のカロテノイドに加え、6 種類のエポキシカロテノイドを検出することができた (図 3-5, 表 3-A)。一方、以前の報告¹⁰⁰で、ヒトが吸収しないとされたエポキシルテインやエポキシゼアキサンチンは検出されなかった。各カロテノイドの定量値を表 3-5 に示した。一方、Khachik らが報告した HPLC/UVVIS による定量値は、異性体の合計値を計算するとベータカロテン 130-330 nmol/l, アルファカロテン 81-190 nmol/l, ベータクリプトキサンチン 150-0.370 nmol/l, ルテイン 230-390 nmol/l, ゼアキサンチン 83-120 nmol/l であった¹⁰¹。ほとんどのカロテノイドの平均値は文献値の範囲内に収まり、収まらなかったものでも同じオーダーで検出されていた。被験者の人種が本論文と異なることとカロテノイドの血中濃度が食餌の影響を強く受けることを考慮にいと、本論文中で構築した分析系は妥当な定量値を与えていると考えられる。その報告では血中カロテノイドの分析に 6 ml もの血液を用いられたが、今回の分析に要したサンプル量はわずかに 0.1ml であった。このことから、本分析系が保存血清を利用する場合などの小さなスケールでの分析において有用であることが示唆された。

次に血液中のカロテノイド運搬体である LDL 中のカロテノイドプロファイル獲得を試みた。近年の研究により、LDL の酸化がアテローム動脈硬化に深く関与していることが明らかとなった¹⁰²⁻¹⁰⁴。以前の報告で *in vitro* での LDL 酸化に際して、顕著なカロテノイドの

減少が脂質の過酸化物の生成よりも前に認められることが示されている^{105,106}。よって LDL 中のカロテノイドやその酸化物であるエポキシカロテノイドは LDL 酸化のバイオマーカーとなりうると考えられる。健常者の血清 2ml から回収した 2.5 mg protein LDL からのカロテノイド検出を試みたところ、6 種類のエポキシカロテノイドを検出することができ、本分析システムが、小スケールでの LDL 分析に対応していることが示された (図 3-5B)。

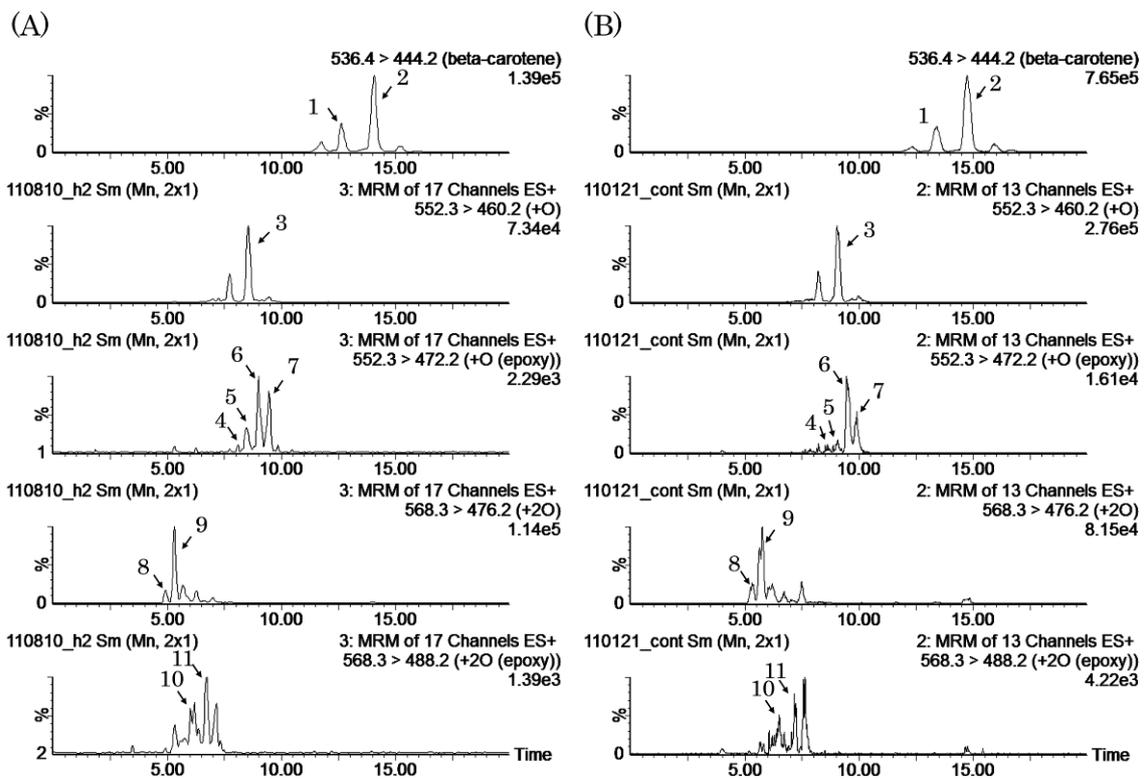


図 3-5 (A)血清および(B)LDL のヘプタン抽出物の SFC/MS/MS により得られた MRM クロマトグラム

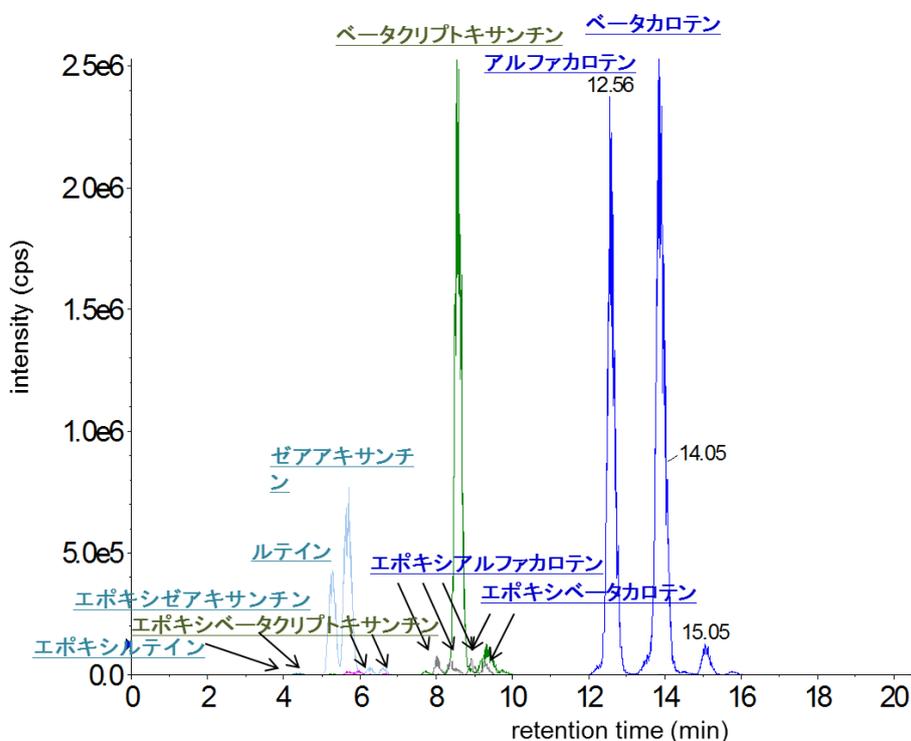
各カロテノイドの番号については、表 3-4 に示している。

表 3-5 ヒト健常者の血清中カロテノイドの定量値

carotenoid	^a concentration [nmol/l]	
	mean	range
α -carotene	79	21-130
β -carotene	200	68-320
β -cryptoxanthin	92	42-250
lutein	430	250-590
zeaxanthin	140	70-270

^a8 人の血清中カロテノイドの分析結果

(A)SFC/MS/MS によるカロテノイドおよびカロテノイドエポキシドの一斉分析



(B)SFC/MS/MS によるカロテノイドの検出感度

カロテノイド	LOD (fmol)
アルファカロテン	0.19
ベータカロテン	0.093
ベータクリプトキサンチン	0.091
ルテイン	0.18
ゼアキサンチン	0.18

図 3-7 本章のまとめ

(A)カロテノイドおよびエポキシ化反応物の混合物の SFC/MS/MS による分析例. C18 カラムを用いることで 20 分以内に対象カロテノイドを分離できた. (B)SFC/MS/MS によるカロテノイドの検出感度. SFC を用いた場合 ESI-MS/MS をカロテノイド分析に適用できるため, 高感度な分析が可能で, sub-fmol の高感度分析が可能になった.

3-4. 考察

本章では、SFC/MS の効果的な応用例としてカロテノイドおよびエポキシカロテノイドの分析系を構築した。疎水性代謝物の分離分析に有用な SFC の適用により、エポキシ体とその異性体であり生体内に存在する主要なヒドロキシカロテノイドとの分離を短時間で達成することができた。また、MS/MS を用いることにより、従来の PDA を用いた分析に比べ、高感度にカロテノイドの部分構造に関する情報を取得できた。また、特定のプロダクトイオンをモニターすることによりヒドロキシカロテノイドと異性体の関係にあるエポキシカロテノイドの精度の高い検出が可能であった。

HPLC を用いた場合、構造類縁体の分離にはカロテノイドカラムとして市販されているポリメリックタイプの C30 カラムが必要である。C30 カラムはカロテノイドの構造異性体の分離に力を発揮するものの、強い疎水性相互作用が生じることや、エンドキャッピングをあえて行っていないことからピーク形状が悪く、理論段数が低下するという欠点がある。理論段数の低下は、複雑なマトリックスが存在する実試料分析において検出感度や定量性の低下を招く。一方 SFC を用いた場合、C30 カラムよりも疎水性領域の小さな C18 カラムでもカロテノイド構造類縁体を効率良く良好に分離することが可能であった。これは、第二章でも述べたとおり、水素結合性相互作用や立体選択性など、疎水性相互作用以外の、固定相の微細構造に由来する相互作用の影響も強く受け、ユニークな溶離挙動を示すためであると考えられる。

プロダクトイオンスキャンによる構造情報の獲得や MRM による高選択、高感度の定量分析が可能な MS/MS は多成分の一斉分析が必要とされる代謝解析には必須の分析技術であるといえる。しかし、カロテノイドにおける MS/MS の応用は限定された範囲に留まっている。現在のところ、カロテノイドのイオン化法には APCI 法が ESI 法よりも用いられている。理由としては、APCI 法の方がカロテノイドのような低極性代謝物のイオン化に適していること、またカロテノイドを溶離するために必要な非極性溶媒リッチな条件では ESI

におけるイオン化効率が顕著に低下することが挙げられる。しかし、APCIをイオン化法として採用した場合、プロダクトイオンスキャンを行なっても低 m/z 側にポリエチン由来の m/z 14 ほどの繰り返しパターンを含んだスペクトラムを得ることはできるものの、部分構造情報を含んだフラグメントパターンを獲得することができない。このため、カロテノイド分析において MS/MS を用いる有用性が認められず、適用例が限定されていると考えられる。

本研究では SFC をクロマトグラフィーとして用いることで、ESI でのイオン化に適したメタノールでのカロテノイド類の溶出を可能にした。このことにより、ESI-MS/MS をカロテノイド分析に適用することが可能になった。APCI-MS/MS をカロテノイド分析に応用することのアドバンテージが明確でないのに対し、ESI-MS/MS では明確である。高感度に構造情報を含むフラグメントパターンを獲得可能であること、構造情報を利用した MRM により選択的に高感度の定量が可能になることである。実際、APCIにより定量フラグメントイオンが比較的高効率に生成するリコペンにおいても検出下限値が 11 fmol であったのに対し、当該分析系が示したカロテノイド類の検出下限値である 0.2 fmol であり現在報告されているどの報告よりも高感度である。このことから、SFC/ESI-MSMS が疎水性代謝物の高感度分析において有用であることが示唆された。これまで SFC の応用技術開発はキラル分取に特化して行われてきたため、基本的には高感度の検出器は必要なく、分光光度計の適用がほとんどであった。質量分析計が検出器として用いられる場合においても、精製物の定性確認程度に留まっており、タンデム質量分析は積極的に用いられてこなかった。しかし、本研究の結果は少なくとも脂溶性代謝物において、質量分析と接続するのに適したクロマトグラフィーは LC よりも SFC であることを示唆している。

クロマトグラフィーにおける優れたパフォーマンスと MS/MS による高感度化により、小スケールでの分析や、LDL など生体内微量構成物のカロテノイド分析が可能になった。カロテノイドプロファイルは環境に敏感に応答して変動するため、バイオマーカーの有力な

候補であり、特に酸化ストレスの存在の直接的な証拠となりうるエポキシカロテノイドやそのカロテノイド中の存在比は、食餌による影響を大きく受けるカロテノイド本体よりも有用なバイオマーカーとなりうる。酸化 LDL は心筋梗塞や脳血管障害などの致死的な疾患の原因となる動脈硬化の原因物質であり、診断指標である^{107,108}。しかし現在の酸化 LDL 測定法はマロンジアルデヒドなどの酸化脂質や変性タンパク質などをターゲットとしており、酸化 LDL の中でも末期状態にあるものしか検出できないと考えられる。LDL 中には比較的高濃度のカロテノイドが存在しており、LDL における主要な抗酸化物質であると考えられている。以前の報告で *in vitro* での LDL 酸化に際して、顕著なカロテノイドの減少がマロンジアルデヒドなどの脂質の過酸化物の生成よりも前に認められることが示されている^{105,106}。前述の通り、カロテノイドは食餌による影響を大きく受けるため、カロテノイドの減少を直接 LDL の酸化と結びつけることはできないが、エポキシカロテノイドなどのカロテノイド酸化生成物が LDL 酸化の敏感なバイオマーカーとなりうることを示唆している。

本分析系は小スケールの多検体を迅速に分析可能であり、バイオマーカー探索に必要な 2 つの条件を満たしているといえる。高分離の SFC および高選択性、高感度の MS/MS の組み合わせが今後、生体内のさまざまな脂溶性代謝物分析に有用なツールとして運用されることが期待される。

第四章 総括

本論文では、従来キラル分取に特化して応用開発されてきた SFC をカロテノイド分析に応用することで、SFC の代謝物分析におけるアドバンテージを明確に示した。

第二章では、逆相カラムを用いた SFC は脂溶性代謝物の分離において有用な分離モードであることを示した。

有用性の一つはクロマトグラフィーとしての能力の高さである。SCCO₂ はヘキサン程度の低極性とされ、脂溶性代謝物の溶解力や溶出力に優れている。このため、サンプル負荷量を増加させることや、迅速な脂溶性成分の溶出を行なうことができる。また、構造類縁体が多数存在するため、LC では分離に C30 カラムを要するカロテノイド類を SFC は C18 カラムで分離可能であった。これは、2-4 でも述べたとおり、SFC では疎水性相互作用以外の化合物カラム間相互作用を効果的に利用することができるためであると考えられる。SF の高い拡散性により、カラムの微細構造にまで移動相が行き渡ることがこの現象の原因の一つであると推察される。

もう一つの有用性は質量分析との親和性である。高疎水性代謝物は逆相 LC においてヘキサンや酢酸エチルなどの低極性溶媒で溶出する必要があり、イオン化にプロトン性溶媒を必要とする大気圧下イオン化法による質量分析における感度が低下する。逆相カラムを用いた SFC では、低極性のカロテノイド類をイオン化に適したメタノールを用いることにより溶離させることができるため、この問題を解決することができる。結果として、ベータカロテンの検出下限値が SFC/MS では 60 fmol と LC/MS と比較して高感度の分析系を構築することができた。

第三章では、SFC/MS/MS の効果的な応用により、存在量の多い構造異性体（カロテノイドヒドロキシド）が存在し、なおかつ微量成分のため従来手法では分析の困難なカロテノイドエポキシドの分析系を構築した。

第二章と同様に C18 カラムを用いることで、ヒトに蓄積される 5 種の主要なカロテノイドおよびそのエポキシ体を分離分析できた。LC を用いて C30 カラムで分離するよりも高い理論段数で分析できるため、検出感度の向上や複雑なマトリックスが存在する実試料分析において夾雑物の影響や定量性の低下を避けることができた。

また、ESI-MS/MS との接続により、微量カロテノイドの構造情報の獲得や、高選択かつ高感度の定量が可能であることを示した。従来カロテノイドのイオン化に一般的に用いられている APCI 法では、構造情報に富むプロダクトイオンを得ることができないため、カロテノイドの検出に MS/MS は積極的に応用されてこなかった。逆相カラムを用いた SFC はメタノールによりカロテノイド類を溶出できるため、定性および定量に有用なフラグメントを与える ESI-MS/MS への接続が可能である。特に本研究で示した 0.1 fmol (ベータカロテン) という検出下限値は従来法の 50 倍もの高感度であり、SFC/ESI-MS/MS が脂溶性代謝物の高感度分析における技術的なブレークスルーとなりうることを示している。

クロマトグラフィーにおける優れたパフォーマンスと高感度化により SFC/MS/MS は脂溶性代謝物の多成分一斉分析に有用であることを示した。これらの性質から、小スケールの多検体分析が必要とされるバイオマーカー探索などに SFC/MS/MS が力を発揮することが期待される。

既に述べたとおり、SFC は分取精製技術として高い能力を有している。このことは、発見したバイオマーカーの、NMR などによる更なる構造解析や生理活性スクリーニングなどに必要な分取精製操作を SFC で一貫して行なうことができることを示している。分析スケールのクロマトグラフィーから分取クロマトグラフィーへのスケールアップに関する知見は既に蓄積されているため、迅速に移行することができる。

もう一つの SF のユニークな運用法として、抽出操作のオンライン化が挙げられる。超臨界流体は高い拡散性および溶解力を兼ね備えており、高い抽出効率を有している。そのため、通常の LC や GC では実現不可能な抽出操作のオンライン化が可能である。このシステ

ムは多検体のハイスループットスクリーニングに有用であるだけでなく、抽出から検出まで酸素や光に触れることがないため、抽出操作中に容易に分解されてしまうような代謝物を安定に抽出、分析できると考えられる。このシステムを、種々の疾病で変動することが報告されている酸化ストレスマーカーであるコエンザイム Q_{10} のレドックスステータス解析へ応用することを試みた。光合成細菌中の還元型コエンザイム Q_{10} の存在比をオンラインおよびオフライン（有機溶媒）抽出の二つの方法を用いて求め、比較したところ、オンライン抽出の方が有意に高い還元型存在比を示した¹⁰⁹。このことから、オンライン SFE システムはインタクトの生体内代謝情報の獲得のために有用な分析技術となることが期待される。

本研究では選択性や感度、適用範囲など代謝物解析に重要な仕様について検討することにより SFC が代謝物解析技術として有用であることを明らかにした。SFC/MS の高い分離性能および感度を効果的に適用することにより様々な代謝物の分析を効率的に進めることができることから、今後の代謝研究の新たな展開が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科、福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文作成にあたり有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科、渡邊肇教授、村中俊哉教授に心から厚く感謝申し上げます。

また、学部4年からの6年間、懇切なるご指導を賜り、また日頃からご助言と励ましの言葉を頂きました大阪大学大学院工学研究科、馬場健史准教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益なご助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科、平田收正教授、原田和生助教に心から深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日頃より貴重なご助言を頂きました大阪大学工学研究科、小野比佐好助教に深く感謝いたします。

本研究で使用した緑藻サンプルの分析と日頃より有益なご助言を頂きました神戸大学医学研究科、和泉自泰研究員に深く感謝いたします。

本研究で使用したヒト血清サンプルの提供と有益なご助言を頂きました神戸大学医学研究科、吉田優准教授、入野康宏助教、篠原正和研究員、西海信研究員に深い感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、多大なる協力を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域、超臨界流体グループの内方崇人修士、李載元修士、山本隆士修士、Allan Ochieng 修士、角田省二修士、石橋愛実学士、三田穂高学士、山田貴之学士および生物資源工学領域、諸先輩方、学生諸氏、事務の方々に心から感謝の意を表します。

最後に、これまで常に支え続けてくれた家族、友人無くして本研究は成し得なかったことを付記致します。

引用文献

1. 化学工学会超臨界流体部会編, 「超臨界流体入門」
2. 牧野圭佑, 「超臨界流体クロマトグラフィー」
3. Gere, D.R. Supercritical fluid chromatography. *Science* **222**, 253 (1983).
4. Smith, R.M. Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality, and the future. *Journal of Chromatography A*. **856**, 83-115 (1999).
5. Taylor, L.T. Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *The Journal of Supercritical Fluids* **47**, 566-573 (2009).
6. Kurnik R. T., Reid R. C., Solubility of solid mixtures in supercritical fluids, *Fluid Phase Equilibria*, **8**, 93-105 (1982).
7. Reverchon E., Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *The Journal of Supercritical Fluids*, **10**, 1-37 (1997).
8. Méndez-Santiago J., Teja A. S., The solubility of solids in supercritical fluids, *Fluid Phase Equilibria*, **158**, 501-510 (1999).
9. Hedrick J. L., Mulcahey L. J., Taylor L. T., Supercritical Fluid Extraction, *Mikrochimica Acta*, **132**, 115-132 (1992).
10. Langenfeld J., Hawthorne S., Miller D., Effects of Temperature and Pressure on Supercritical Fluid Extraction Efficiencies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls, *Analytical Chemistry*, **65**, 338-344 (1993).
11. Reverchon E., Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *The Journal of Supercritical Fluids*, **10**, 1-37 (1997).
12. West B. L., Kazarian S. G., Vincent M. F., Brantley N. H., Eckert C. A., Supercritical fluid dyeing of PMMA films with azo-dyes, *Journal of Applied Polymer Science*, **69**, 911-919 (1998).

13. Savage P. E., Organic Chemical Reactions in Supercritical Water., *Chemical reviews*, **99**, 603-622 (1999).
14. Sasaki M., Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water, *The Journal of Supercritical Fluids*, **13**, 261-268 (1998).
15. Imahara H., Xin J., Saka S. Effect of CO₂/N₂ addition to supercritical methanol on reactivities and fuel qualities in biodiesel production, *Fuel*, **88**, 1329-1332 (2009).
16. Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A., High pressure gas chromatography above critical temperatures, *Journal of Organic Chemistry*, **27**, 700-701 (1962).
17. Giddings J., Myers M., McLaren L., High pressure gas chromatography of nonvolatile species, *Science*, **162**, 67-73 (1968).
18. Miller L., Potter M. Preparative chromatographic resolution of racemates using HPLC and SFC in a pharmaceutical discovery environment. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **875**, 230-236 (2008).
19. Guiochon G., Tarafder A. Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of chromatography. A*, **1218**, 1037-1114 (2011).
20. Fukusaki E., Kobayashi A. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of bioscience and bioengineering* **100**, 347-54 (2005).
21. Lei Z., Huhman, D., Sumner, L.W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 25435-25442 (2011).
22. Bamba T. , Shimonishi N., Matsubara A., Hirata K., Nakazawa Y., Kobayashi A., Fukusaki E.. High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics, *Journal of bioscience and bioengineering* **105**, 460-469 (2008).
23. 高市真一, 「カロテノイド～その多様性と生理活性～」

24. Bartley G. E., Scolnik P., Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health, *The Plant Cell*, **7**, 1027-1038 (1995).
25. Bilger W., Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*, *Photosynthesis Research*, **25**, 173-185 (1990).
26. Demmig-Adams B., Adams W. W., The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, *Trends in Plant Science*, **1**, 21-26 (1996).
27. Edge R., McGarvey D., Truscott T. G., The carotenoids as anti-oxidants — a review, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **41**, 189-200 (1997).
28. Koh W.-P. *et al.*, Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese Health Study., *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, **21**, 685-690, (2011).
29. Buijsse B, Feskens E. J., Kwape L., Kok F. J., Kromhout D., Both alpha- and beta-carotene, but not tocopherols and vitamin C, are inversely related to 15-year cardiovascular mortality in Dutch elderly men. *Journal of Nutrition*, **138**, 344-350 (2008).
30. D'Odorico A., Martines D., Kiechl S., Egger G., Oberhollenzer F., Bonvicini P., Sturniolo G. C., Naccarato R., Willet J. High plasma levels of alpha- and beta-carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Atherosclerosis*. **153**, 231-229 (2000).
31. Sluijs I., Beulens J. W., Grobbee D. E., Schouw Y. T., Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. *Journal of Nutrition*, **13**, 987-992 (2009)
32. Sugiura M., Nakamura M., Ogawa K., Ikoma Y., Matsumoto H., Ando F., Shimokata H., Yano M.. Associations of serum carotenoid concentrations with the metabolic syndrome: interaction

- with smoking, *British Journal of Nutrition*, **29**, 1-10 (2008)
33. Hammond B. R., Ciulla T. A., Snodderly D. M., Macular pigment density is reduced in obese subjects, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **43**, 47-50 (2002).
 34. Montonen J., Knekt P., Järvinen R., Reunanen A.. Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes, *Diabetes Care*, **27**, 362-366 (2004).
 35. Dherani M. K., Murthy G. V., Gupta S. K., Young I., Maraini G., Camparini M., Price G. M, John N., Chakravarthy U., Fletcher A., Blood levels of vitamin C, carotenoids and retinol are inversely associated with cataract in a north Indian population. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **49**, 3328-3335, (2008)
 36. Christen W. G, Liu S., Glynn R. J., Gaziano J. M., Buring J. E., Dietary carotenoids, vitamins C and E, and risk of cataract in women: a prospective study. *Archives of Ophthalmology*, **126**, 102-109 (2008).
 37. Tamimi R. M., Colditz G, Hankinson S. E., Circulating carotenoids, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer, *Cancer Research*, **69**, 9323-9329, (2009).
 38. Mignone L. I., Giovannucci E., Newcomb P. A., Titus-Ernstoff L., Trentham-Dietz A., Hamptonm J.M., Willettm W.C., Eganm K.M., Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer, *International Journal of Cancer*, **124**, 2929-2937 (2009).
 39. Key T. J, et al., Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and the risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **86**, 672-681 (2007).
 40. Peters U., Leitzmann M. F., Chatterjee N., Wang Y., Albanes D., Gelmann E. P., Friesen M. D., Riboli E., Hayes R. B., Serum lycopene, other carotenoids, and prostate cancer risk: a nested case-control study in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **16**, 962-982 (2007).

41. Michaud D. S., Feskanich D., Rimm E. B., Colditz G. A., Speizer F. E., Willett W. C., Giovannucci E., Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **72**, 990-997 (2000).
42. Persson C., Sasazuki S., Inoue M., Kurahashi N., Iwasaki M., Miura T., Ye W., Tsugane S., for the JPHC Study Group, Plasma levels of carotenoids, retinol, and tocopherol and the risk of gastric cancer in Japan: A nested case-control study, *Carcinogenesis*, **29**, 1042-1048 (2008).
43. Yuan J. M., Ross R. K., Gao Y. T., Qu Y. H., Chu X. D., Yu M. C., Prediagnostic levels of serum micronutrients in relation to risk of gastric cancer in Shanghai, China, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **13**, 1772-1780 (2004).
44. Lancaster J., Lister C., Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122**, 594-598 (1997).
45. Saks L., McGraw K., Horak P., How feather colour reflects its carotenoid content, *Functional Ecology*, **17**, 555-561 (2003).
46. Armstrong G. A., Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants, *Journal of Bacteriology*, **176**, 4795 (1994).
47. Takaichi S., Mochimaru, M., Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 2607-2619, (2007).
48. Takaichi S., Inoue K., Akaike M., Kobayashi M., Oh-oka H., Madigan M. T., The major carotenoid in all known species of heliobacteria is the C30 carotenoid 4,4'-diaponeurosporene, not neurosporene., *Archives of Microbiology*, **168**, 277-281 (1997).
49. Palczewski K., Chemistry and biology of vision., *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 1612-1619 (2012).

50. Rando R. R., Polyenes and vision, *Chemistry and Biology*, **3**, 255-262, (1996).
51. Gutierrez-Mazariegos J., Theodosiou M., Campo-Paysaa F., Schubert M., Vitamin A: a multifunctional tool for development, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **22**, 603-610 (2011).
52. Cvekl A., Wang, W.-L., Retinoic acid signaling in mammalian eye development, *Experimental Eye Research*, **89**, 280-291 (2009).
53. Hetherington A. M., Guard Cell Signaling, *Cell*, **107**, 711-714 (2001).
54. Kim T.-H., Böhmer M., Hu H., Nishimura N., Schroeder J. I., Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling, *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 561-591 (2010).
55. Weitbrecht K., Müller K., Leubner-Metzger G., First off the mark: early seed germination, *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3289-3309 (2011).
56. Šírová J., Sedlářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M., The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen, *Plant Science*, **181**, 560-572 (2011).
57. Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., “ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants, *Journal of Plant Research*, **124**, 509-525 (2011).
58. Chinnusamy V., Gong Z., Zhu J.-K., Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses, *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 1187-1195 (2008).
59. Nagamune K., Hicks L. M., Fux B., Brossier F., Chini E. N., Sibley L. D., Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*, *Nature*, **451**, 207-210 (2008).
60. M. Umehara *et al.*, Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones, *Nature*, **455**, 195-200 (2008).

61. Gomez-Roldan V. *et al.*, Strigolactone inhibition of shoot branching, *Nature*, **455**, 189-194 (2008).
62. Lobo G. P., Amengual J., Palczewski G., Babino D., Lintig J., Carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis in mammalian biology, *Biochimica et biophysica acta*, **1821**, 78-87 (2012).
63. Landrum, J. T., & Bone, R. A.. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of biochemistry and biophysics*, **385**, 28-40 (2001).
64. Melendez-Martinez, A. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J., *Journal of Food Composition Analysis*, **20**, 638-649 (2007).
65. Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A., Costa, H. S., *Journal of Food Composition Analysis*, **19**, 97-111 (2006).
66. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, **246**, 64-71, (1989).
67. Carroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N., Haegele K. D., Horning E. C., Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system, *Analytical Chemistry*, **47**, 2369-2373 (1975).
68. Albert K., Strohschein S., Lacker T., Separation and identification of various carotenoids by C30 reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, **854**, 37-44 (1999).
69. Careri M., Elviri L., Mangia A., Liquid chromatography – electrospray mass spectrometry of b-carotene and xanthophylls Validation of the analytical method, *Journal of Chromatography A*, **854**, 233-244 (1999).

70. Schmitz H. H., Artz W. E., Poor C. L., Dietz J. M., Erdman J. W., High-performance liquid chromatography and capillary supercritical-fluid chromatography separation of vegetable carotenoids and carotenoid isomers, *Journal of Chromatography A*, **479**, 261-268 (1989)..
71. Ibañez, E., Separation of carotenoids by subcritical fluid chromatography with coated, packed capillary columns and neat carbon dioxide, *Journal of Chromatography A*, **823**, 313-319 (1998)..
72. Aubert M.-C., Lee C. R., Krstulović A. M., Lesellier E., Péchard M.-R., Tchaplá A., Separation of *trans/cis*- α - and β -carotenes by supercritical fluid chromatography I. Effects of temperature, pressure and organic modifiers on the retention of carotenes, *Journal of Chromatography A*, **557**, 47-58 (1991).
73. Lesellier, E., Tchaplá, A., Péchard, M.-R., Lee, C.R. & Krstulović, A.M. Separation of *trans/cis* α - and β -carotenes by supercritical fluid chromatography II. Effect of the type of octadecyl-bonded stationary phase on retention and selectivity of carotenes. *Journal of Chromatography A*, **557**, 59-67 (1991).
74. Lesellier E., Tchaplá, C, Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **633**, 9-23, (1993).
75. Lesellier, E. Additional studies on shape selectivity by using the carotenoid test to classify C18 bonded silica. *Journal of Chromatography. A* **1218**, 251-257 (2011).
76. Lesellier E., West C., Combined supercritical fluid chromatographic methods for the characterization of octadecylsiloxane-bonded stationary phases., *Journal of chromatography. A*, **1149**, 345-357 (2007).
77. Lesellier E., West C., Tchaplá A., Classification of special octadecyl-bonded phases by the carotenoid test, *Journal of Chromatography A*, **1111**, 62-70 (2006).
78. Lesellier E., Tchaplá A., A simple subcritical chromatographic test for an extended ODS high

- performance liquid chromatography column classification, *Journal of Chromatography A*, **1100**, 45-59 (2005).
79. West, C., Fougère, L., Lesellier, E., Combined supercritical fluid chromatographic tests to improve the classification of numerous stationary phases used in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography. A* **1189**, 227-44 (2008).
80. Lesellier, E., West, C., Tchaplal, A., Advantages of the use of monolithic stationary phases for modelling the retention in sub/supercritical chromatography. Application to cis/trans-beta-carotene separation, *Journal of Chromatography A*, **1018**, 225-232 (2003).
81. Nakanishi K., Soga N., Phase separation in gelling silica–organic polymer solution: systems containing poly (sodium styrenesulfonate), *Journal of the American Ceramic Society*, **74**, 2518–2530 (1991).
82. Nakanishi K., Soga N., Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formation behavior and effect of solvent composition, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **139**, 1–13 (1992).
83. Nakanishi K., Soga N., Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid II. Effects of molecular weight and temperature, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **139**, 14-24 (1992).
84. Cabrera K., Lubda D., Eggenweiler H.-M., Minakuchi H., Nakanishi K., A New Monolithic-Type HPLC Column For Fast Separations, *Journal of High Resolution Chromatography*, **23**, 93-99 (2000).
85. Lesellier E., Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases, *Journal of Separation Science*, **31**, 1238-1251 (2008).
86. Kao T.-H., Chen C.-J., Chen B.-H., Carotenoid composition in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz as determined by HPLC-MS and affected by freeze-drying and hot-air-drying, *The Analyst*, **136**,

3194-202 (2011)..

87. Novoselov S. V. *et al.*, Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*, *The EMBO journal*, **21**, 3681-3693 (2002).
88. Vega, J. M., Garbayo, I., Domínguez, M. J., & Vígara, J.. Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 163-167 (2006)..
89. Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., Rissanen, T. H., Carotenoids and cardiovascular health, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **83**, 1265-1271 (2006).
90. Heinonen, O.P., Huttunen, J.K., Albanes, D., Haapakoski, J., Palmgren, J., Pietinen, P., Pikkarainen, J., Rautalahti, M., Virtamo, J., Edwards, B.K. and other 113 authors: The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *The New England Journal of Medicine*, **330**, 1029-1035 (1994).
91. Lowe, G. M., Vlismas, K., Graham, D. L., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Young, A. J., The degradation of (all-E)- β -carotene by cigarette smoke, *Free Radical Research*, **43**, 280-286 (2009).
92. Yamauchi, R., Tsuchihashi, K., Kato, K., Oxidation products of beta-carotene during the peroxidation of methyl linoleate in the bulk phase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1301-1306 (1998)
93. Yeh, S. -L., Hu, M. -L., Induction of oxidative DNA damage in human foreskin fibroblast Hs68 cells by oxidized beta-Carotene and lycopene, *Free Radic. Res.*, **35**, 203-213 (2001).
94. Salgo, M. G., Cueto, R., Winston, G. W., Pryor, W. A.: Beta carotene and its oxidation products have different effects on microsome mediated binding of benzo[a]pyrene to DNA, *Free Radical. Biology and Medicine*, **26**, 162-173 (1999).
95. Barua, A. B., Intestinal absorption of epoxy-beta-carotenes by humans, *Biochemical Journal.*,

- 339**, 359-362 (1999).
96. Chopra, M., O'Neill, M. E., Keogh, N., Wortley, G., Southon, S., Thurnham, D. I., Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers, *Clinical Chemistry*, **46**, 1818-1129, (2000).
 97. Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Akimoto, N.: Characterization of epoxy carotenoids by fast atom bombardment collision-induced dissociation MS/MS, *Lipids*, **39**, 179-183 (2004).
 98. Rosso, V., Mercadante, A.: Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **55**, 5062-5072 (2007).
 99. Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P., Graulet, B.: Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**, 777-790 (2010).
 100. Barua A., "Xanthophyll Epoxides, Unlike β -Carotene Monoepoxides, Are Not Detectibly Absorbed by Humans," *The Journal of Nutrition*, **131**, 3212-3215 (2001).
 101. Khachik, F., Spangler, C. J., Smith, J. C., Canfield, L. M., Steck, A., Pfander, H.: Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum, *Analytical. Chemistry*, **69**, 1873-1881 (1997).
 102. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L.: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *The New England Journal of Medicine*, **320**, 915-924 (1989).
 103. Witztum, J. L., The oxidation hypothesis of atherosclerosis, *Lancet*, **344**, 793-795 (1994).
 104. Itabe, H., Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **26**, 1-9 (2003).
 105. Dugas, T. R., Morel, D. W., Harrison, E. H., Impact of LDL carotenoid and alpha-tocopherol

- content on LDL oxidation by endothelial cells in culture, *Journal of Lipid Research*, **39**, 999-1007 (1998).
106. Romanchik, J., Addition of lutein, lycopene, or β -carotene to LDL or serum in vitro: effects on carotenoid distribution, LDL composition, and LDL oxidation, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **8**, 681-688 (1997).
107. Yamaguchi, Y., Kunitomo, M., Haginaka, J., Assay methods of modified lipoproteins in plasma, *Journal of Chromatography B*, **781**, 313-330 (2002).
108. Steinerová, A., Racek, J., Stozický, F., Zima, T., Fialová, L., Lapin, A., Antibodies against oxidized LDL--theory and clinical use, *Physiological Research.*, **50**, 131-141 (2001).
109. Matsubara, A., Harada, K., Hirata, K., Fukusaki, E., Bamba, T., High-accuracy analysis system for the redox status of coenzyme Q₁₀ by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, **1250**, 76–79 (2012)

発表論文

本学位論文に關与する論文

- 1) Matsubara, A., Bamba, T., Ishida, H., Fukusaki, E. & Hirata, K. Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **32**, 1459–64 (2009).
- 2) Matsubara, A., Uchikata, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E., Bamba, T., Highly sensitive and rapid profiling method for carotenoids and their epoxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization- triple quadrupole mass spectrometry, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**, 782–787 (2012)

その他の原著論文

- 1) Matsubara, A., Harada, K., Hirata, K., Fukusaki, E., Bamba, T., High-precision analysis system for the redox status of coenzyme Q₁₀ by online supercritical fluid extraction- supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1250**, 76–79 (2012)
- 2) Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis., *Journal of Chromatography A*, **1250**, 69–75 (2012)
- 3) Hori, K., Matsubara, A., Uchikata, T., Tsumura, K., Fukusaki, E., Bamba, T., High-throughput and sensitive analysis of 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*,

1250, 99–104 (2012)

- 4) Uchikata, T., Matsubara, A., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E., Bamba, T., Development of oxidized phosphatidylcholine isomer profiling method using supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, **1250**, 205–211 (2012)
- 5) Lee, J.W., Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean. *Journal of bioscience and bioengineering* **113**, 262-268 (2011).
- 6) Lee, J.W., Yamamoto, T., Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., Development of a polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *Journal of separation science* **34**, 3553-60 (2011).
- 7) Wada, Y., Matsubara, A., Uchikata, T., Iwasaki, Y., Morimoto, S., Kan, K., Okura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., ‘Metabolic profiling of b-cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, **34** (2011).
- 8) Bamba, T. , Shimonishi, N., Matsubara, A., Hirata, K., Nakazawa Y., Kobayashi, A., Fukusaki, E. A high throughput and exhaustive lipid profiling method by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **105**, 460-469 (2008)

本論文は 2009 年度生物工学論文賞を受賞した

総説等

- 1) Bamba, T., Lee, J. W., Matsubara A., Fukusaki, E., Metabolic profiling of hydrophobic compounds by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1250**, 212-219 (2012)

- 2) Matsubara, A., Fukusaki, E. & Bamba, T. Metabolite analysis by supercritical fluid chromatography. *Bioanalysis* **2**, 27-34 (2010).

- 3) 松原惇起, 福崎英一郎, 馬場健史, メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性, *生物工学会誌*, **88**, 529-531 (2010)

- 4) 松原惇起, 下西成人, 中澤慶久, 平田收正, 小林昭雄, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による脂質プロファイリング, *Jasco Report*, 超臨界流体クロマトグラフィー特集号 (2008)

学会発表

(国際会議)

- 1) ○Takeshi Bamba, Jae Won Lee, Takashi Yamamoto, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, "Development of polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry", SFC2011, Jul 2011

本発表は SFC2011 Best Poster Award を受賞した

- 2) ○Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Masakazu Shinohara, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Construction of Metabolic Profiling Method for Carotenoid Oxidation Products using Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry", SFC2011, Jul 2011

- 3) ○Yusuke Wada, Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Yugo Iwasaki, Satoshi Morimoto, Katsuta OKan, Tetsuya Ookura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Metabolic profiling of β -cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry", 7th International Conference of the Metabolomics Society, Jun 2011

- 4) ○Takeshi Bamba, Takashi Yamamoto, Jae Won Lee, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, "Development of polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry", 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Jun 2011

- 5) ○Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Masakazu Shinohara, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Development of metabolic profiling method for carotenoid oxidation products

using supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry", 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Jun 2011

- 6) ○Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Shin Nishium, Masakazu Shinohara, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, "Development of oxidized phosphatidylcholines profiling method by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry", 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Jun 2011
- 7) ○Matsubara A., Wada Y., Fukusaki E., Bamba T., "PROFILING OF CAROTENOIDS AND THEIR DERIVATIVES BY SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY", New Developments in Carotenoids Research, Boston, USA, Mar 2011
- 8) ○Bamba T., Matsubara A., Fukusaki, E., "Development of new lipid metabolomics system using supercritical fluid chromatography/mass spectrometry", Pacificchem 2010, Honolulu, USA, Dec 2010
- 9) ○Matsubara, A., Wada, Y., Fukusaki, E., Bamba, T. "Metabolite profiling of carotenoids and their derivatives by supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry", SFC2010, Stockholm, Sweden, Sep 2010
- 10) ○Matsubara, A., Wada, Y., Ishida, H., Harada, K., Fukusaki, E. Bamba, T., "Profiling system for carotenoids and their oxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry", 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Salt Lake City, USA, May

2010

- 11) ○Bamba, T., Matsubara, A., Fukusaki E., “Application of supercritical fluid technologies to profiling of various lipophilic metabolites”, Philadelphia, USA, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, June 2009
- 12) ○Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., “Lipid Profiling of Soybean by Using Supercritical Fluid Chromatography/mass spectrometry.”, 4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering, Seoul, Korea, Nov 2008
- 13) ○Bamba, T., Matsubara, A., Hirata, K., Nakazawa, Y., Kobayashi, A., Fukusaki, E., “Application of supercritical fluid chromatography to analysis of hydrophobic metabolites.”, SFC 2008, Zurich, Switzerland, Oct 2008
- 14) ○Matsubara, A., Ishida, H. Harada, K. Fukusaki, E. Bamba, T., “Application of Supercritical Fluid Technologies to hydrophobic metabolite profiling”, the 5th International Conference on Plant Metabolomics, Yokohama, Japan, July 2008
- 15) ○Bamba, T., Matsubara, A., Hirata, K., Fukusaki, E., “A high throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography - mass spectrometry for metabolomics”, the 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Colorado Convention Center, Denver, USA, June 2008
- 16) ○Bamba T., Fukusaki E., Matsubara A., Ishida H., Nakazawa Y., Kobayashi A., Hirata K.

“Development of high-throughput, high-resolution lipid metabolomics system using supercritical fluid chromatography”, The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Tokyo, Sep 2007

(国内学会)

- 1) ○石橋愛実, 松原惇起, 内方崇人, 酒井美穂, 安藤孝, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析を用いた単一観測システムによる残留農薬迅速一斉分析方法の開発」, 『日本農芸化学会 2012 年度大会』, 京都, 2012 年 3 月
- 2) ○石橋愛実, 松原惇起, 内方崇人, 酒井美穂, 安藤孝, 福崎英一郎, 馬場健史, 「SFC-MS/MS を用いた残留農薬迅速一斉分析方法の開発」, 『第 34 回農薬残留分析研究会』, 高知, 2012 年 11 月
- 3) ○松原惇起, 内方崇人, 篠原正和, 安田知行, 石田達郎, 西海信, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析による カロテノイド酸化生成物プロファイリングシステムの構築」, 『第 6 回メタボロームシンポジウム』, 大阪, 2011 年 10 月
- 4) ○内方崇人, 松原惇起, 西海信, 篠原正和, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた 酸化ホスファチジルコリン異性体の解析」『第 6 回メタボロームシンポジウム』, 大阪, 2011 年 10 月
- 5) ○Jae Won Lee, 山本隆士, 内方崇人, 松原惇起, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた極性脂質プロファイリング法の開発」, 『第 6 回メタ

ポロームシンポジウム』, 大阪, 2011年10月

- 6) ○和田雄介, 松原惇起, 内方崇人, 岩崎雄吾, 森本聡, 菅剋太, 大倉哲也, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析を用いた β -クリプトキサンチン脂肪酸エステル分析技術の開発」, 『第6回メタボロームシンポジウム』, 大阪, 2011年10月
- 7) ○石橋愛実, 松原惇起, 酒井美穂, 安藤孝, 福崎英一郎, 馬場健史, 「SFC/MS/MS を用いた残留農薬分析方法の開発」, 『第6回メタボロームシンポジウム』, 大阪, 2011年10月
- 8) ○松原惇起, 内方崇人, 篠原正和, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/タンデム質量分析によるカロテノイド誘導体プロファイリングシステムの開発」, 『第59回質量分析総合討論会』, 大阪, 2011年9月
- 9) ○内方崇人, 松原惇起, 西海信, 篠原正和, 吉田優, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた酸化ホスファチジルコリン異性体分析系の構築」, 『第59回質量分析総合討論会』, 大阪, 2011年9月
- 10) ○Jae Won Lee, Takashi Yamamoto, Takato Uchikata, Aatsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, “Development of a polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry”, 『第59回質量分析総合討論会』, 大阪, 2011年9月
- 11) ○松原惇起, 和田雄介, 表正克, 栗山尚浩, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマ

トグラフィーにおける分離特性の解析—カラム修飾が分子認識能に与える影響について—, 『第 62 回日本生物工学会大会』, 宮崎, 2010 年 10 月

12) ○和田雄介, 松原惇起, 岩崎雄吾, 森本聡, 菅剋太, 大倉哲也, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィーを用いたベータクリプトキサンチンエステル分析技術の開発」, 『第 62 回日本生物工学会大会』, 宮崎, 2010 年 10 月

13) ○馬場健史, 松原惇起, 和田雄介, 福崎英一郎, 「超臨界流体利用技術のカロテノイドプロファイリングへの応用」, 『第 5 回メタボロームシンポジウム』, 鶴岡, 2010 年 9 月

14) ○松原惇起, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析によるカロテノイド分析系の構築」, 『第 37 回 BMS コンファレンス』, 沖縄, 2010 年 7 月

本発表は日本質量分析学会 2009 年度 BMS トラベルアワード受賞講演として行われた

15) ○松原惇起, 和田雄介, 岩崎雄吾, 森本聡, 大倉哲也, 菅剋太, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析を用いたカロテノイドエステル類の代謝プロファイリング」, 『第 58 回質量分析総合討論会』, つくば, 2010 年 6 月

16) ○馬場 健史, 李 載元, 内方 崇人, 松原 惇起, 中村 卓司, 福崎 英一郎, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による脂質プロファイリング」, 『日本農芸化学会 2010 年度大会』, 東京, 2010 年 3 月

17) ○LEE, J. W., Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., "Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry (SFC/MS) to lipid profiling of soybean", 『第 61 回日本生物工学会大会』, 名古屋, 2009 年 9 月

- 18) ○松原惇起, 石田洋基, 平田收正, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析によるカロテノイド類代謝プロファイリング」, 『第 57 回質量分析総合討論会』, 大阪, 2009 年 5 月
- 19) ○内方崇人, 松原惇起, 中村卓司, 福崎英一郎, 馬場 健史, 「超臨界クロマトグラフィー/質量分析を用いた大豆の脂質プロファイリング」, 『日本農芸化学会 2009 年度大会』, 福岡, 2009 年 3 月
- 20) ○馬場健史, 李載元, 内方崇人, 松原惇起, 中村卓司, 福崎英一郎, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による脂質プロファイリング」, 『日本農芸化学会 2009 年度大会』, 福岡, 2009 年 3 月
- 21) ○松原惇起, 石田洋基, 原田和生, 平田收正, 福崎英一郎, 馬場健史, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた脂溶性代謝物の高速・精密分析」, 『第 60 回日本生物工学会大会』, 仙台, 2008 年 8 月
- 22) ○石田洋基, 松原惇起, 原田和生, 平田收正, 福崎英一郎, 小林昭雄, 馬場健史, 「微細藻類におけるストレス応答物質の機能解析—緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のアブシジン酸性合成経路の解析」, 『第 60 回日本生物工学会大会』, 仙台, 2008 年 8 月
- 23) ○松原惇起, 石田洋基, 馬場健史, 平田收正, 「微細藻類におけるストレス応答物質とその応用 (第二報) —緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のアブシジン酸性合成経路の解析」, 『日本薬学会第 128 年会』, 横浜, 2008 年 3 月
- 24) 松原惇起, ○石田洋基, 福崎英一郎, 馬場健史, 平田收正, 「超臨界流体クロマトグラフ

ィー/質量分析を用いた脂溶性代謝物の高速・精密分析」,『日本薬学会第 128 年会』, 横浜, 2008 年 3 月

25) ○松原惇起, 馬場健史, 和泉自泰, 福崎英一郎, 小林昭雄, 平田收正, 「微細藻類におけるストレス応答物質とその応用 (第一報) — 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のアブシジン酸性合成経路の解析」, 『日本薬学会第 127 年会』, 富山, 2007 年 3 月

26) ○馬場健史, 松原惇起, 福崎英一郎, 小林昭雄, 中澤慶久, 平田收正, 「超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析(SFC/MS)の脂質プロファイリングへの応用」, 『日本薬学会第 127 年会』, 富山, 2007 年 3 月