

Technical Report

超臨界流体クロマトグラフィー Supercritical fluid chromatography

寺田 英敏¹、内方 崇人¹、服部 孝成¹、松本 恵子¹、渡部 悦幸¹、山口 忠行¹、舟田 康裕¹

Abstract:

近年、カラムテクノロジーの進歩により、液体と比較して低粘性・高拡散性などの特性を持つ超臨界流体を移動相として用いる超臨界流体クロマトグラフィーが改めて注目されています。ここでは超臨界流体クロマトグラフィーの基本原則からNexera UCシステムを用いた高速高分離分析例や光学異性体の分離分析についてご紹介いたします。

Keywords: 超臨界流体クロマトグラフィー、SFC、supercritical fluid chromatography

1. 超臨界流体とは

超臨界流体 (Supercritical Fluid) とは、温度、圧力共に臨界点以上の物質の状態を意味し (Fig. 1)、気体と比較して物質を溶解する能力を有し、液体と比較して高拡散性・低粘性であるなどの特性を持ち合わせています (Table 1)。種々の物質は固有の臨界点を有しますが、特に二酸化炭素は臨界温度が31.1℃、臨界圧力が7.38 MPaと臨界点が低いため、取り扱いが容易であり、なおかつ不燃性・不活性・安価であることなどの理由により、ホップエキスやフレーバーなどの抽出やコーヒー豆からの脱カフェインなど、工業的にも広く使用されています (Fig. 2)。一方、分析分野でも超臨界流体を主な移動相として使用する超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography: 以下SFC) と超臨界流体を主な抽出溶媒として使用する超臨界流体抽出 (Supercritical Fluid Extraction: 以下SFE) 等が使用されています。

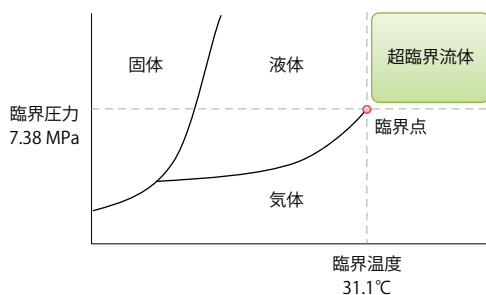


Fig. 1 二酸化炭素の状態図

Table 1 超臨界流体の物性

	拡散係数 (cm ² /s)	密度 (g/cm ³)	粘度 (g/cm·s)
液体	10 ⁻⁶	1	10 ⁻²
超臨界流体	10 ⁻³	0.2~0.8	10 ⁻³
気体	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴

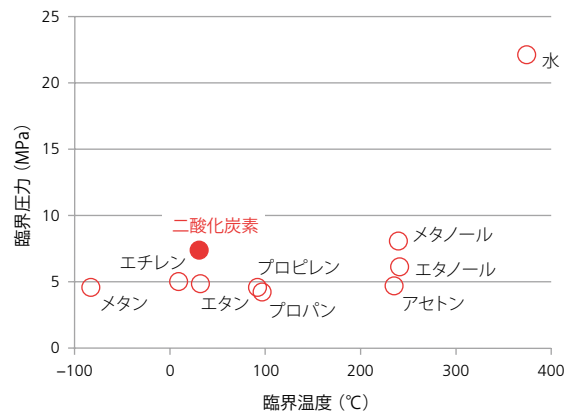


Fig. 2 種々の物質の臨界点

2. 超臨界流体クロマトグラフィーとは

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は主たる移動相として超臨界流体 (多くの場合は超臨界流体二酸化炭素) を用いた分離分析手法です。超臨界流体は低粘性・高拡散性などの特性を有することから、従来のHPLCによる分離分析と比較してカラム背圧が低く、高流量領域での送液による高速分析や、カラム延長による高分離分析などを実現します。また、昨今のSFCシステムや専用パッキングカラムなどの進歩により、HPLCと同様の操作体系での分析を可能としています。

超臨界流体二酸化炭素はヘキサンと同程度の疎水性を有しますが、多くの場合これだけではカラムから目的成分を溶出することはできません。そこでSFC分析では移動相にモディファイアーと呼ばれる有機溶媒を加えることにより、移動相の極性を変化させることでカラムから目的成分を溶出させる手法が用いられます。モディファイアーにはメタノール、エタノール、イソプロピルアルコールやアセトニトリルなど、二酸化炭素と混和する有機溶媒が用いられています。また、極性の高い成分を分析する際には、ギ酸や酢酸などの酸、ギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムなどの塩、ジエチルアミンなどの塩基を有機溶媒に加えたものがモディファイアーとして用いられます。

3. Nexera UC

Nexera UCシステムには①SFCシステム、②オンラインSFE-SFCシステム、③オフラインSFEシステムなどがラインアップされており、様々な分析や前処理などの目的に応じてシステムを構築することが可能です。HPLCとの装置的な大きな違いは二酸化炭素送液用のポンプと移動相のカラム内での気化を防ぐために必要となる背圧制御弁が追加される点です。Nexera UCは超高速液体クロマトグラフNexeraをベースとし、SFC用に新たに開発した二酸化炭素送液ユニット (LC-30ADsf) と高精度な圧力コントロールを可能とした背圧制御ユニット (SFC-30A)、SFEを行う際に使用する抽出ユニット (SFE-30A) を追加することにより、それぞれのシステムを構成することができます (Fig. 3)。なお、SFCシステムで使用するオートサンブラなどのLC用ユニットも、一部の部品のみを変更することで日本国内の高圧ガス保安法に対応することが可能です。

① SFCシステム

UV (またはPDA) 検出を使用するSFC-UVシステム、SFCの高速性に対応した質量分析計を用いるUFMSシステム (SFC-MS)、複数のカラムとモディファイアーを自動で切り換えて分析条件の検討を行うことができるキラルスクリーニングシステムなどがラインアップされています。

② オンラインSFE-SFCシステム

SFEとSFCをオンラインで結合することにより、固体試料から目的成分の抽出と分離分析までを全自動で行うことができるシステムです。

③ SFE前処理システム

固体試料から目的成分を抽出することに特化したオフラインSFE前処理システムです。

Nexera UCのSFCシステムでは超臨界流体特有の高拡散性や低粘性などにより、高流速領域での分析においてもカラム負荷圧は低く、且つカラム効率を損なうことなく高速分析を可能とすることから、HPLCと同じ粒子径の充てん剤カラムを用いて分析した場合、HPLCと比べて3~5倍程度の分析時間の短縮化を実現することができます (Fig. 5)。

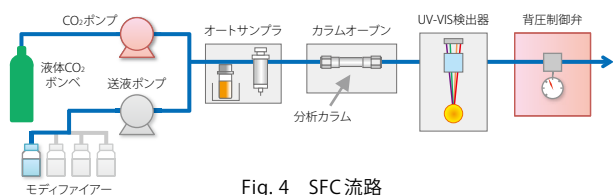
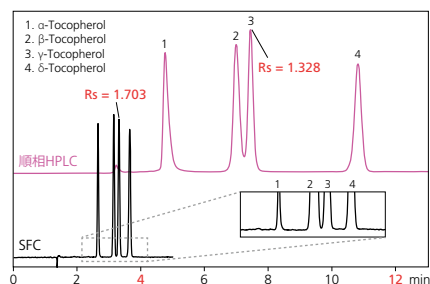


Fig. 4 SFC 流路



SFC 条件	順相 HPLC 条件
カラム : Shim-pack UC-SIL (4.6 mmI.D.×250 mmL, 5 μm)	カラム : Shim-pack HRC-SIL (4.6 mmI.D.×250 mmL, 5 μm)
モディファイアー : MeOH	移動相 : HEX/IPA 99/1 (V/V)
モディファイアー比率 : 5 %	流量 : 1 mL/min
流量 : 3.5 mL/min	温度 : 40℃
温度 : 40℃	検出 : UV 290 nm
検出 : UV 290 nm	背圧 : 10 MPa
背圧 : 10 MPa	

Fig. 5 HPLCとSFC比較

SFC-UVシステム



SFC-MSシステム



Fig. 3 Nexera UCシステム

また、分離に用いるカラム充てん剤としてシリカゲルなど順相HPLCと同じものを用いることにより、Fig. 5に示すように分離を改善しつつ高速化も達成した状態で、順相HPLC分析をSFCへ容易に移行することもできます。また、Fig. 6に示すように1回の分析に必要な有機溶媒消費量を大幅に削減できることから、分析にかかるコストを削減することもできます。SFCは有害な有機溶媒の使用量を低減することができることから、分析者や環境に優しい分析手法と言えます。

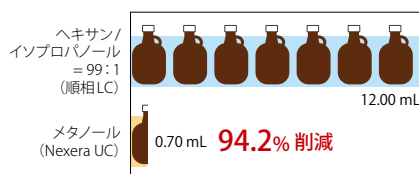
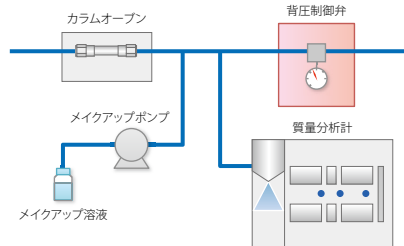


Fig. 6 HPLCとSFCの溶媒消費量比較

検出器に質量分析計を用いる場合、LC/MSで使用されている装置をそのまま用いることができます。SFCでは、イオン化の促進を目的としてカラム分離後にメイクアップ溶液を添加する手法が用いられます。従来のSFCシステムでは背圧制御弁の内部容量が大きいことから、カラム外拡散の影響を回避するために質量分析計にはスプリットされた一部のみ導入する流路で分析されていました (Fig. 7a)。Nexera UCシステムの背圧制御弁は独自の低内部容量設計により (特許出願中)、質量分析計に直列に接続してカラム溶出液の全量を質量分析計へ導入することができます (Fig. 7b)。これにより質量分析計への導入量が多くなり、より高感度な分析を可能とし、スプリット比の変動などの影響もなく再現性の高いSFC/MS分析を実現できます (Fig. 8、Table 2)。

(a) 従来のSFC/MS流路



(b) Nexera UCのSFC/MS流路

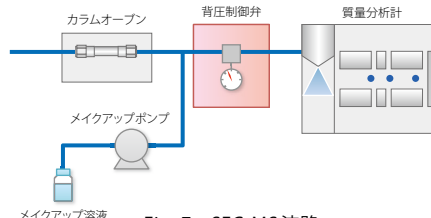
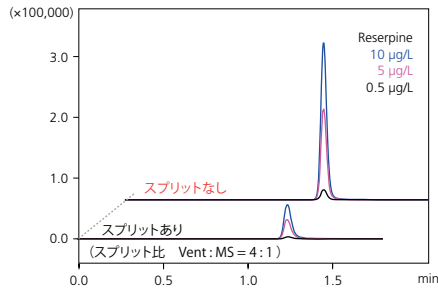
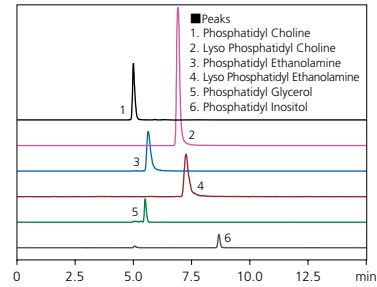


Fig. 7 SFC-MS 流路



カラム : Shim-pack UC-Diol 4.6 mmI.D.×150 mmL.
 モディファイアー : MeOH
 モディファイアー比率 : 30 %
 流量 : 3.0 mL/min
 温度 : 40℃
 背圧 : 10 MPa
 注入量 : 1 µL
 成分 : レセルピン (0.5、5、10 µg/L)
 検出 : TQ質量分析計 ESI(+) m/z 609.3 > 195.0

Fig. 8 スプリットの有無による感度比較



カラム : Shim-pack UC-Diol 4.6 mmI.D.×150 mmL. 5 µm
 モディファイアー : 0.1 % W/V 硝酸アンモニウムを含む MeOH
 モディファイアー比率 : 10 % (0 min) → 40 % (10-15 min)
 流量 : 3.0 mL/min
 温度 : 40℃
 メイクアップ溶液 : 0.1 % W/V 硝酸アンモニウムを含む MeOH
 メイクアップ流量 : 0.1 mL/min
 背圧 : 10 MPa
 検出 : TQ質量分析計 (ESI)

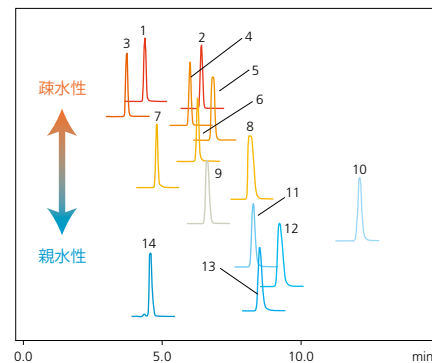
Fig. 9 リン脂質分析

Table 2 MSへのスプリット有無による再現性

	注入量 (µL)	保持時間		面積		高さ	
		平均	%RSD	平均	%RSD	平均	%RSD
スプリットあり	0.1	0.359	0.64	6,583	18.83	2,361	17.29
	1	0.356	0.25	81,467	4.26	26,656	3.88
	2	0.355	0.32	156,831	2.18	49,721	3.28
スプリットなし	0.1	0.356	0.09	16,264	6.18	7,673	6.17
	1	0.353	0.05	155,170	2.43	71,971	2.23
	2	0.35	0.07	325,739	1.16	142,350	1.19

カラム : Shim-pack UC-Diol 4.6 mmI.D.×150 mmL. 5 µm
 モディファイアー : 0.1 % W/V 硝酸アンモニウムを含む MeOH
 モディファイアー比率 : 30 %
 流量 : 2.0 mL/min
 温度 : 40℃
 背圧 : 10 MPa
 注入量 : 1 µL
 検出 : TQ質量分析計 ESI(-) m/z 351.20 > 271.20 (prostaglandin 100 µg/L)

Fig. 10に Shim-pack UC-RPを用いた疎水性から親水性まで幅広い極性の農薬成分を分析例を示します。Shim-pack UC-RPは、ODS基と極性官能基の両方を併せ持った固定相であり、疎水性から親水性まで幅広い成分を保持することができるユニークなカラムです。これまで同じ条件では分析が困難であった農薬類を一斉分析することができ、分析の効率化を実現することができます。



No.	成分	log P
1	Carbofuran	7.4
2	Ethofenprox	6.9
3	Fenpropathrin	6.0
4	Pyriproxyfen	5.0
5	Pyraclostrobin	4.0
6	Linuron	3.0
7	Aminocarb	1.9
8	Ethoxysulfuron	1.0
9	Halosulfuron methyl	0.0
10	Bentazone	-0.5
11	Chlorsulfuron	-1.0
12	Rimsulfuron	-1.5
13	Nicosulfuron	-1.8
14	Vamidotion	-4.2

カラム : Shim-pack UC-RP 4.6 mmI.D.×150 mmL. 5 µm
 モディファイアー : 0.1 % W/V 硝酸アンモニウムを含む MeOH
 モディファイアー比率 : 0 % (0 min) → 10 % (11 min) → 30 % (14 min) → 40 % (14.01-17 min)
 流量 : 3.0 mL/min
 温度 : 40℃
 メイクアップ溶液 : 0.1 % W/V 硝酸アンモニウムを含む MeOH
 メイクアップ流量 : 0.1 mL/min
 背圧 : 15 MPa
 検出 : TQ質量分析計 (ESI)

Fig. 10 農薬分析

4. SFC専用カラム Shim-pack UCシリーズ

SFCは移動相の拡散性が高いことからカラム固定相の種類やモディファイアーの種類によって分離の挙動が大きく変化します。

Shim-pack UCシリーズはSFC専用カラムであり、Table 3に示す8種類の固定相がラインアップされています。これにより、多種多様な化合物の分離に対応することができます。

Table 3 Shim-pack UCシリーズラインアップ

	官能基	細孔径	表面積	炭素量
Shim-pack UC-RP	オクタデシル基+極性官能基	10 nm	450 m ² /g	9%
Shim-pack UC-GIS II	オクタデシル基			11%
Shim-pack UC-Diol	ジオール基			20%
Shim-pack UC-Sil	—			—
Shim-pack UC-Amide	カルバモイル基			18%
Shim-pack UC-NH2	アミノプロピル基			8%
Shim-pack UC-Phenyl	フェネチル基			9.5%
Shim-pack UC-CN	シアノプロピル基			14%

Fig. 9に Shim-pack UC-Diolを用いたリン脂質の分析例を示します。順相LCと同様にクラス別に分離することが可能です。同様のモディファイアー条件において、ODS基を固定相とするShim-pack UC-GIS IIなどを用いるとリン脂質の分子種分離も可能です。SFCでは移動相は同じでも用いる固定相によってHPLCにおける順相的な保持や逆相的な保持挙動を示すこともあり、多彩な分離を可能としているため、複雑な試料の解析に大きな力を発揮します。

5. 光学異性体の分析

製薬分野における創薬合成ではキラルカラムを用いた高速かつ迅速な光学分割法が研究されています。しかし、多種多様なキラルカラムから分析種に適した分析カラムと移動相の組み合わせを見出すには多大な労力と時間を要することから、キラル分離条件スクリーニングの迅速化が求められています。

島津製作所の“Nexera UC キラルスクリーニングシステム”と多糖誘導体型キラルカラム“CHIRALPAK®シリーズ”、“CHIRALCEL®シリーズ”（ダイセル社製）を組み合わせることで、キラル化合物の高分離条件の迅速化と省力化を図ることができます。

Nexera UC キラルスクリーニングシステムは、SFCシステムと溶媒切換バルブやカラム切換バルブで構成されており、最大12本のカラムに対して自動かつ連続的にモディファイアー条件を変更し、網羅的にデータ採取することができます。また移動相ブレンド機能により、4種類のモディファイアーを任意の比率で混合し、様々な分離条件で分析できることからキラル化合物の条件検討のワークフローを大幅に低減することが可能です。

また、“Method Scouting Solution for Nexera UC”はグラフィカルなユーザーインターフェイス環境を提供しており、キラル化合物の分離条件プロセスを支援する目的で開発されたソフトウェアです（Fig. 11）。使用する分析カラムや移動相、モディファイアーはデータベース管理されるため、管理効率が向上すると共に複数のオペレータが使用する場合でも操作ミスを低減することができます。モディファイアーやサンプルの必要量の算出、劣化抑制を目的としたカラム洗浄や分析終了時の封入液置換、さらには分析終了時間の予測など、キラル化合物の分析検討に関する作業を強力にサポートします。

ここではオメプラゾールを12本の光学分割カラム（ダイセル社製）と、3種類のモディファイアー条件の組み合わせによる全36通りのスクリーニング結果を示します（Fig. 12、13）。

Nexera UC キラルスクリーニングシステムはSFCの利用により移動相選択と分離の最適化を短時間に行うことができることから、製薬の創薬段階におけるR&D効率の向上に有用です。

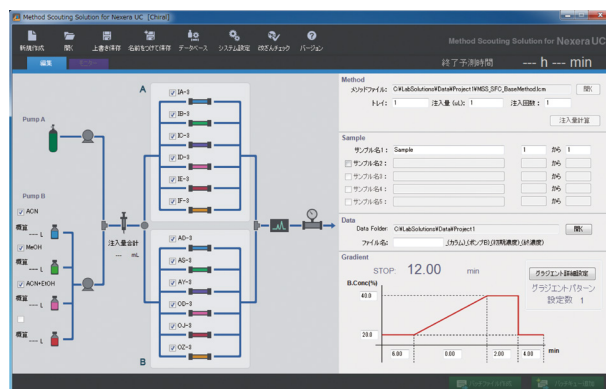


Fig. 11 Method Scouting Solution 設定画面

カラム ①CHIRALPAK IA-3/SFC ②CHIRALPAK IB-3/SFC ③CHIRALPAK IC-3/SFC ④CHIRALPAK ID-3/SFC ⑤CHIRALPAK IE-3/SFC ⑥CHIRALPAK IF-3/SFC ⑦CHIRALPAK AD-3/SFC ⑧CHIRALPAK AS-3/SFC ⑨CHIRALPAK AY-3/SFC ⑩CHIRALCEL OD-3/SFC ⑪CHIRALCEL OJ-3/SFC ⑫CHIRALCEL OZ-3/SFC	×	モディファイアー ①MeOH ②EtOH ③Acetonitrile/EtOH 75/25 (V/V)
3.0 mmI.D.×100 mmL. 3 μm		

Fig. 12 スクリーニング条件

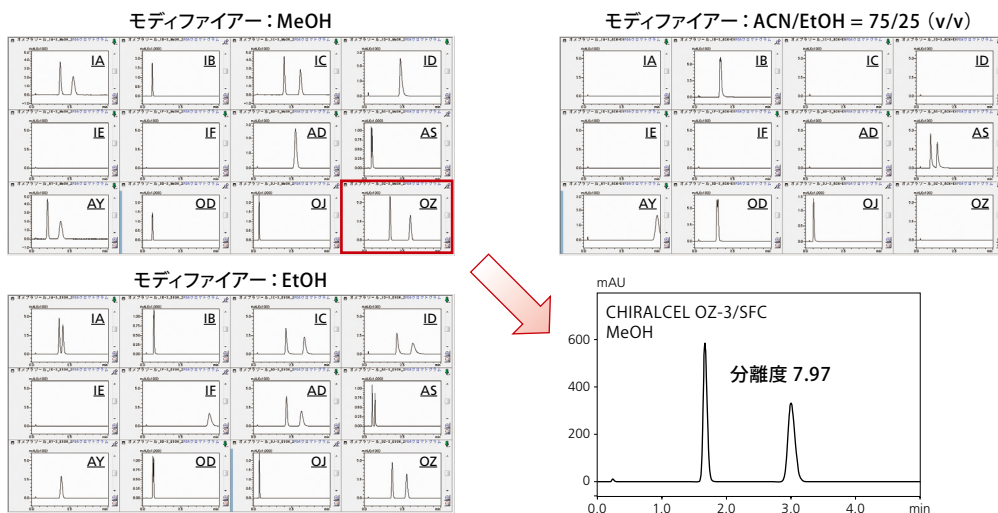


Fig. 13 スクリーニング結果

CHIRALPAK, CHIRALCELは、株式会社ダイセルの登録商標です。

株式会社 島津製作所
 分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2016年3月
 © Shimadzu Corporation, 2016