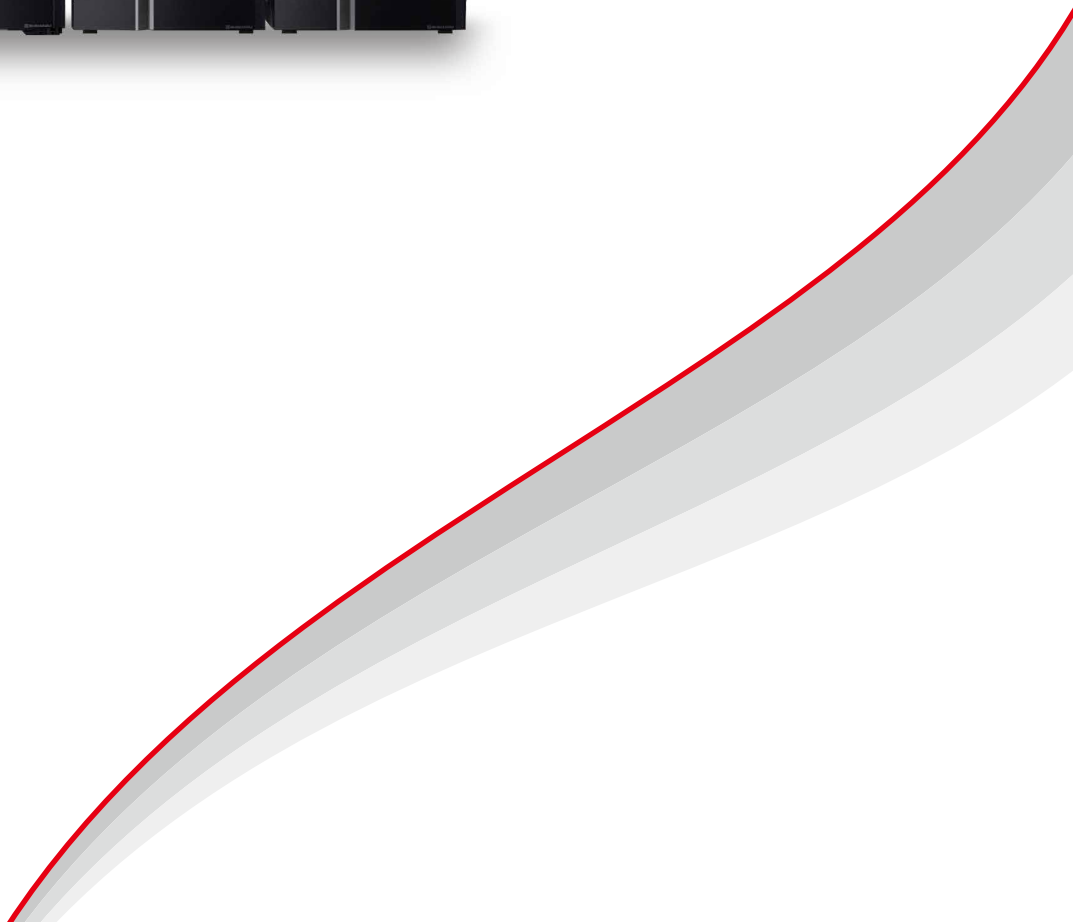


高速液体クロマトグラフ

SFC Basic Guide

SFC ベーシックガイド





超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography : SFC) で使用するCO₂ボンベ内のCO₂は、アンモニア製造や石油精製プラントなどで製造された超臨界二酸化炭素が充填されています。つまり、SFCでCO₂を使用しても新たなCO₂は産出されません。一方、HPLCの移動相に使用する有機溶媒を廃棄処理する時には、新たなCO₂が発生します。従って、分離の手段をHPLCからSFCに切り換えることは、温室効果ガスであるCO₂の排出量を削減し、国連が提唱する持続可能な開発目標 (SDGs) のひとつである「13. 気候変動に具体的な対策を」に繋がるとも言えます。

本カタログでは、SFCに関する基礎的な知識を集約しました。

目次

第1章 超臨界流体クロマトグラフィーとは	2
1-1 超臨界流体の特性	2
1-1-1 超臨界流体の物理的性質	2
1-1-2 超臨界二酸化炭素	3
1-2 超臨界流体クロマトグラフィーとは	4
1-2-1 クロマトグラフィーについて	4
1-2-2 超臨界流体クロマトグラフィー	4
1-2-3 超臨界流体クロマトグラフィーで用いる装置	5
1-3 SFCによる分析の特長	6
1-3-1 低極性—構造認識能の高さ	7
1-3-2 有機溶媒との混和性—分離パターンの拡張	7
1-3-3 低粘性—超高速分析の実現	8
1-3-4 気化—LC-MS検出感度の向上	10
1-4 SFCによる分取	11
第2章 超臨界流体クロマトグラフ:Nexera UC	13
2-1 SFCシステム	13
2-2 UHPLC/SFC切換システム:Nexera UC/s	14
2-3 分取SFCシステム	15
2-3-1 スタックフラクションシステム	15
2-3-2 マルチフラクションシステム	15
2-3-3 分析フラクションシステム	16
2-3-4 気液分離セパレーター:LotusStream	16
2-4 オンラインSFE-SFCシステム	17
2-5 オフラインSFE-SFCシステム	19
第3章 SFC分析条件のパラメータ	20
3-1 SFCで使用されるカラム	21
3-1-1 カラムの選択	22
3-1-2 Shim-pack UCシリーズ	23
3-2 SFCの移動相	24
3-2-1 モディファイアー	24
3-2-2 添加剤による分離調整、ピーク形状の改善	25
3-2-3 その他分離に影響するファクター	25
3-3 SFCメソッド開発をサポート:メソッドスカウティングシステム	26
第4章 SFCのソリューション例	28
4-1 SFCによるトリグリセリドの分析	28
4-2 SFCによるキラル化合物の分離	29
4-3 オフラインSFEを用いた天然物中化合物の迅速抽出	31
4-4 オンラインSFE-SFC-QTOFMSを用いたシクレソニド吸入剤の迅速分析	32
4-5 SFCを用いた揮発性香気成分の分取精製	33
第5章 SFCに関するよくある質問	34
5-1 SFCの設置	34
5-2 試料・対象成分	35
5-3 移動相	35
5-4 カラム	36
5-5 その他	36

第1章 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: Supercritical Fluid Chromatography) は移動相に超臨界二酸化炭素を用いる分離手法です。SFCという技術は、HPLCが発展する前より存在した技術ですが、近年装置やカラムの技術の発展により汎用的な測定に用いられるようになりました。

低極性でありながら水溶性溶媒と混和可能といった性質をもつ超臨界二酸化炭素という物質の使用により、従来のGCやHPLCによる分離とは異なる新しい分離手法を発展させるポテンシャルがSFCにはあります。本章では、超臨界二酸化炭素という物質と超臨界二酸化炭素によってもたらされる新たな分離手法の基礎知識について説明します。

1-1 超臨界流体の特性

1-1-1 超臨界流体の物理的性質

物質は、温度や圧力によって固体・液体・気体という三つの状態に変化します。気化・昇華は物質の加熱により固体もしくは液体の分子の熱運動が活発になり、物質が状態を保つための分子間力を振り切った際に起こる現象です。CO₂を例にとると、密閉容器中で固体(ドライアイス)が昇華し、高温高圧条件下で“超臨界状態”になります(図1)。超臨界流体とは、超臨界状態にある気体と液体の性質を両方持つ物質のことを意味します。なお、超臨界流体が生成する温度と圧力の条件を臨界点といいます。超臨界流体は液体と気体の中間的な物性を示します(表1)。液体に比べて超臨界流体の拡散係数は高く、密度および粘性が低いのが特徴です。このことから、流体内部での物質の反応速度が早く、物を素早く溶かすことができ、また試料の隙間に素早く浸透することが可能です。

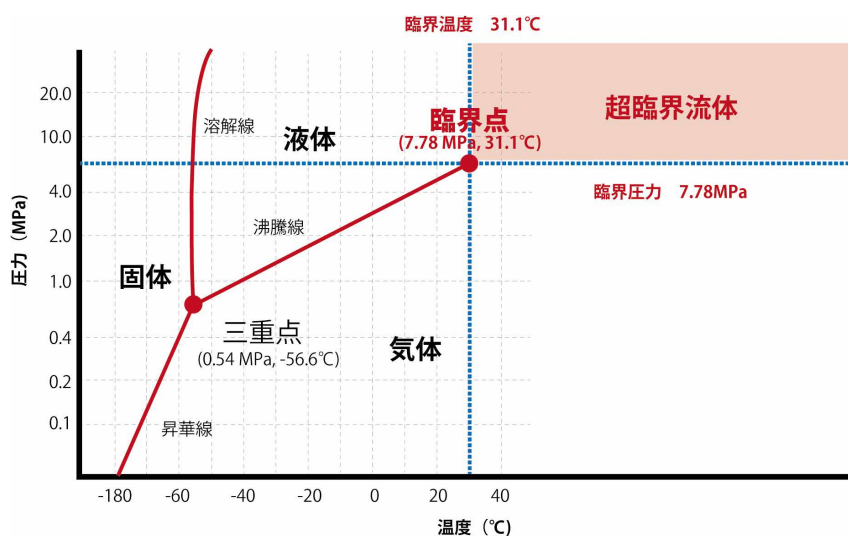


図1 二酸化炭素の状態図

表1 超臨界流体の物理的性質

	拡散係数 (m 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

1-1-2 超臨界二酸化炭素

様々な物質の超臨界流体を生成する臨界圧力と臨界温度を図2に示します。高速液体クロマトグラフィーで汎用的に用いられる水は、臨界圧力は22.1 MPa、臨界温度は374°Cであり、超臨界状態に移させるための環境下に置くことは容易ではありません。一方、超臨界流体クロマトグラフィーで用いられる超臨界二酸化炭素の臨界圧力は7.4 MPa、臨界温度は31.1°Cであり、比較的温和な条件で超臨界状態に移します。

超臨界二酸化炭素は以下のような特長があります。

① 取り扱い

CO₂の臨界点は31°C、7.4 MPaであり、温和な条件で超臨界流体となる。

② 安全性

CO₂は燃焼性がなく、圧縮して使用した場合も爆発の危険性が少ない。また他の有機溶媒と比較してもCO₂そのものの毒性は低い。

③ コスト

CO₂は主に液化炭酸として高圧ボンベで販売されているが、多くの場合安価で手に入れることができる。

④ 環境面

他の有機溶媒は燃焼処理によって破棄され、その際に多量のエネルギーとCO₂を放出する。液化炭酸ガスは発酵過程や他の化学プラントの副産物を回収されているため、使用に伴う環境負荷が低い。

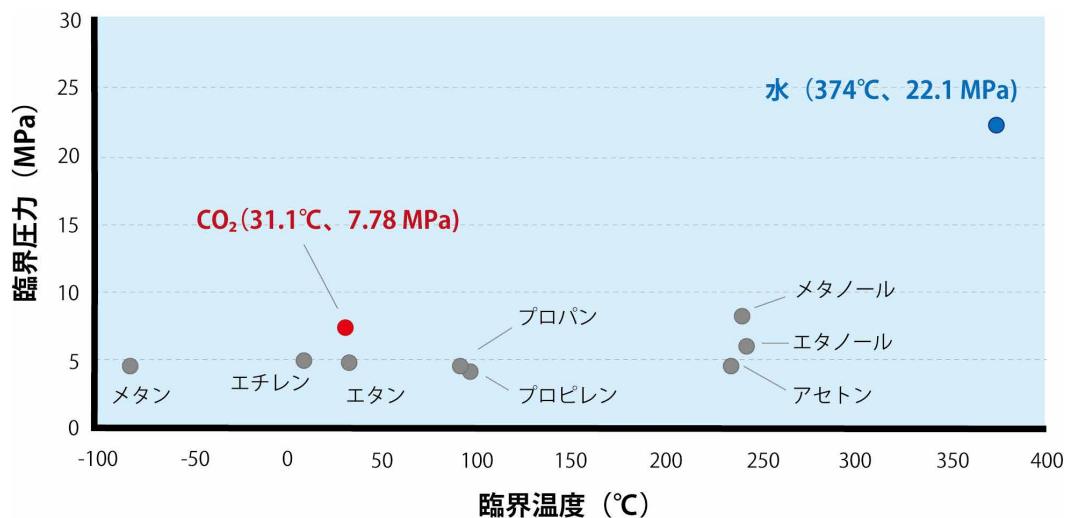


図2 超臨界流体になるための条件

1-2 超臨界流体クロマトグラフィーとは

1-2-1 クロマトグラフィーについて

クロマトグラフィーとは、混合物である試料からターゲットとなる成分を化学的あるいは物理的に分離し、定性、定量、回収などを行う手法の総称です。クロマトグラフィーの手法では、移動相と固定相という2つの相を分離の場とし、このうち移動相に気体を用いる手法がガスクロマトグラフィー (GC: Gas Chromatography)、液体を用いるものが液体クロマトグラフィー (LC: Liquid Chromatography) で、いずれも有機化合物の分析には欠かせない分析手法です。

LCは、移動相送液に用いるポンプ、自動で試料導入するオートサンプラーなど、高性能化した装置ユニットは高速液体クロマトグラフ (HPLC: High Performance Liquid Chromatograph) として用いられています。近年では、固定相に用いる充填剤の微粒化により、高速分析が可能にな高耐圧仕様の装置システムである超高速液体クロマトグラフ (UHPLC: Ultra High Pressure Liquid Chromatograph) の普及が進んでいます。

1-2-2 超臨界流体クロマトグラフィー

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC: Supercritical Fluid Chromatography) は1960年代より分析手法の研究が開始されました。SFCは多くの場合、移動相として超臨界二酸化炭素を利用する手法を指します。SFCは移動相として液体のようにCO₂を用いることから、「CO₂を用いるLC」と言い換えることもできます。

また、従来では広範囲な性質をもっている化合物の測定は複数の分析手法で測定する必要がありましたが、SFCとLCを融合させた“Unified Chromatography”によって、従来では複数の分析手法で測定一斉分析が可能になりました^{*1}。

図3に510成分の農薬混合標準溶液を分析した例、表2に測定対象農薬のオクタノール-水分配係数および再現性・直線性を示します。本手法では、幅広い極性の化合物を一斉に精度よく分析することが可能です。この分析の詳しい内容は、Application News No. L497「Nexera™ UCオンラインSFE-SFC-MSシステムの農産物中残留農薬分析への応用」をご覧ください。

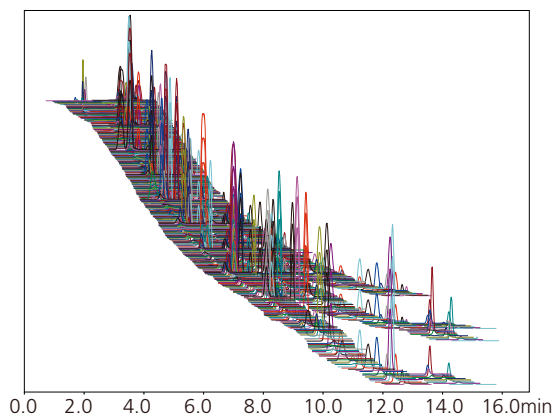


図3 農薬混合標準溶液のマスクロマトグラム

表2 農薬の再現性および直線性

Compounds	LogPow	Repeatability (%RSD, n=5)	Range (ng/g)	R ²
Ethofenprox	6.9	6.1	1-100	0.9991
Hexaflumuron	5.68	6.8	1-100	0.9992
Benzofenap	4.69	1.4	2-200	0.9990
Mepronil	3.66	4.6	1-100	0.9993
Prometryn	3.34	2.7	1-100	0.9994
Fenamidone	2.8	3.0	2-200	0.9991
Ethylchlozate	2.5	3.0	1-100	0.9996
Imazosulfuron	1.6	6.2	1-100	0.9998
Bensulfuron methyl	0.79	8.1	1-100	0.9996
Primisulfuron methyl	0.2	5.5	1-100	0.9994
Halosulfuron methyl	-0.02	5.5	1-100	0.9996
Azimsulfuron	-1.4	4.2	1-100	0.9998

Application News

Nexera UC オンライン SFE-SFC-MS システムの農産物中残留農薬分析への応用

食品中残留農薬の分析では、2006年にポジティブリスト制度が施行されて以降、800種類を超える農薬が規制対象になったことにより、サンプルの前処理も含め、幅広い物性をもつ農薬の多成分一斉分析が求められるケースがあります。

ここでは、超臨界流体抽出と超臨界流体クロマトグラフィーをオンラインで組み合わせた、Nexera UCオンラインSFE-SFC-MSシステムを農産物中の残留農薬分析に応用した事例をご紹介します。



Application >

1-2-3 超臨界流体クロマトグラフィーで用いる装置

SFCに用いる装置はおおよそHPLCと同様の構成です。SFCと、その比較のためにHPLCの流路図を図4に示します。SFCとHPLCの装置構成において大きく異なる点は以下の4つです。

- 超臨界二酸化炭素送液用の専用ポンプ

SFCで用いられる二酸化炭素は冷却されることで液体になります。そのため冷却機能が内蔵されている送液ポンプが必要になります。

- 背圧制御ユニット (BPR: Back Pressure regulator)

装置システム内でCO₂を溶媒(液体もしくは超臨界流体)状態に保ち、気化するのを防ぐためには流路内の圧力を保つためのユニットが必要になります。SFCではUVやPDAなどの検出器の下流もしくは蒸発光散乱検出器(ELSD)や質量分析計(MS)の上流にBPRを設置します^{※2}。BPRは流路の圧力を検知しながら高速で流路の弁を開閉することにより、一定の圧力が常に流路にかかるようにしています。

- モディファイアー送液用ポンプ

SFC分析では、分離を調整するためにメタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒(モディファイアー)を送液し、超臨界二酸化炭素と混合するため、超臨界二酸化炭素とは別の送液ポンプが必要です。

- メイクアップ送液用ポンプ

検出にELSDやMSの使用する場合や分取する場合には、配管の析出の防止または分画物の回収率の向上を目的として溶媒(メイクアップ)を送液します。また、超臨界二酸化炭素にはイオン化促進効果がないため、MS検出時における感度向上のためにもメイクアップ用の溶媒を送液します。

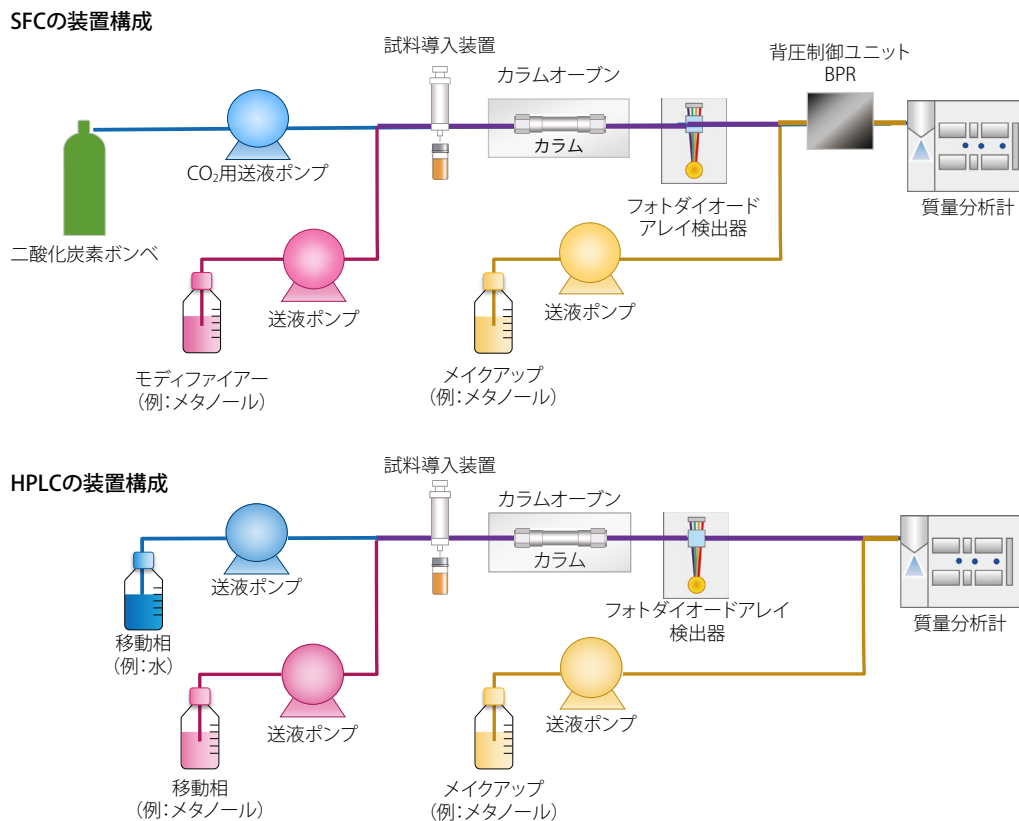


図4 HPLCとSFCの装置構成の比較

1-3 SFCによる分析の特長

SFCの移動相に用いられる超臨界二酸化炭素にはユニークな特性があります。

以下に、SFCの分析における超臨界二酸化炭素の代表的な4つの特長を記します。

① 低極性

超臨界二酸化炭素は*n*-ヘキサンと同程度の極性を示します。

② 有機溶媒との混和性

超臨界二酸化炭素は水溶性溶媒であるメタノールと混和できます。一方、超臨界二酸化炭素と同程度の低極性である*n*-ヘキサンは比較的高極性であるメタノールとは混和できません。

③ 低粘性

超臨界二酸化炭素は水などの溶媒に比べて粘性が低いため、同粒子径、同内径、同じ長さのカラムに同じ流速の超臨界二酸化炭素を送液した場合、カラムからの圧力が低くなります。

④ 気化

臨界点より低温低圧の条件で気化します。

⑤ 溶媒コスト

低極性に述べるように、*n*-ヘキサンと同程度の極性であるため、SFCは順相クロマトグラフィーと同様の分離に用いられます。順相クロマトグラフィーでは大量の溶媒を使用する一方、SFCでは溶媒の消費量と使用済みの廃液の処理も少ないため、総合的な溶媒コストはHPLCに比べて小さいです(図5)。

以下の項目では、①～④に示す超臨界二酸化炭素の特長によって得られるSFC分析の特長について説明します。

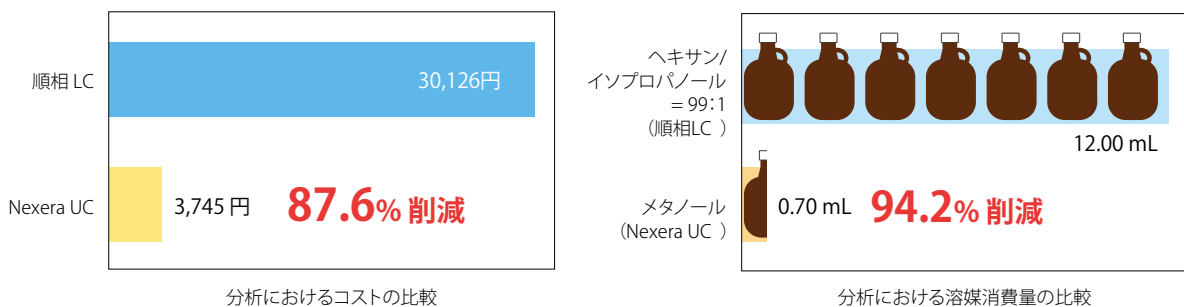


図5 HPLCとSFCの分析コスト、溶媒消費量の比較

1-3-1 低極性—構造認識能の高さ

順相クロマトグラフィーは*n*-ヘキサンなどの低極性の溶媒を移動相、シリカなどの高極性の固定相の使用による分離手法です。順相クロマトグラフィーの特長は、逆相クロマトグラフィーより比較的構造認識能が高いことが特長です。

n-ヘキサンと性質が近い超臨界二酸化炭素を用いるSFCでは、順相クロマトグラフィーと同様に高い構造認識能を有しています(図6)。また、光学活性を有する官能基を結合した固定相を充填したキラルクロマトグラフィー用のカラムの使用により、キラル化合物の分離にも適用されます。

1-3-2 有機溶媒との混和性—分離パターンの拡張

超臨界二酸化炭素はメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール(IPA)、アセトニトリル、テトラヒドロフラン(THF)など特定の有機溶媒と混合が可能です。これらの溶媒はモディファイアーとして超臨界二酸化炭素と混合することにより、SFCはパラエティに飛んだ分離パターンを得ることが可能で、これまでのHPLCでは実現できなかった高極性化合物から低極性化合物の網羅的な分析の実現が期待されています。例えば、脂肪酸の分析にはGC、グリセリドの分析にはHPLCといったように異なる分析手法での測定が必要でしたが、SFCでは超臨界二酸化炭素がヘキサンのような性質を有することと逆相クロマトグラフィーのカラムを組み合わせることで、脂肪酸からグリセリドまでの一斉分析が可能です(図7)。

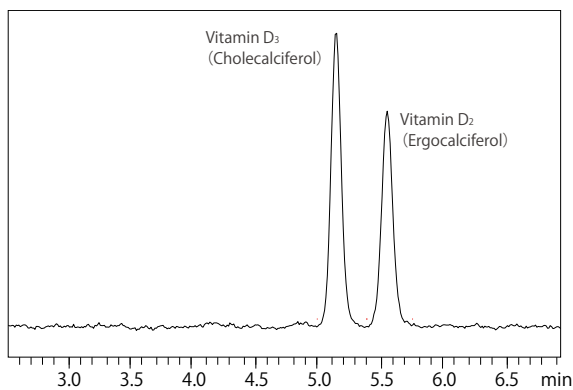


図6 ビタミンD₂とビタミンD₃の分離(UC-PyE)

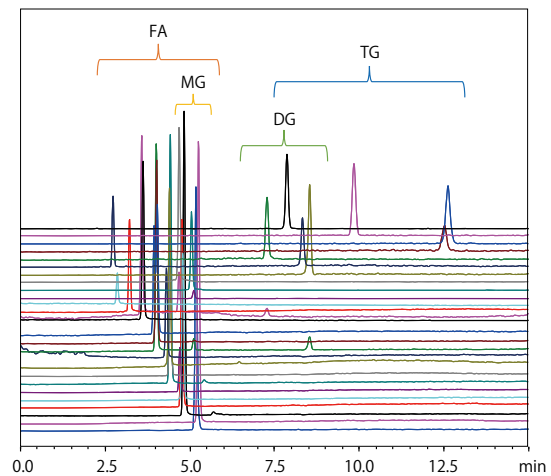


図7 SFCによる脂肪酸およびトリグリセリドの一斉分析例

1-3-3 低粘性—超高速分析の実現

超臨界二酸化炭素は、低粘性かつ拡散係数が高い性質のため、線速度(カラム断面積に対する流速)の高い分析が可能です。線速度とカラム圧をプロットし、HPLCとSFCで比較した結果を図8に示します。

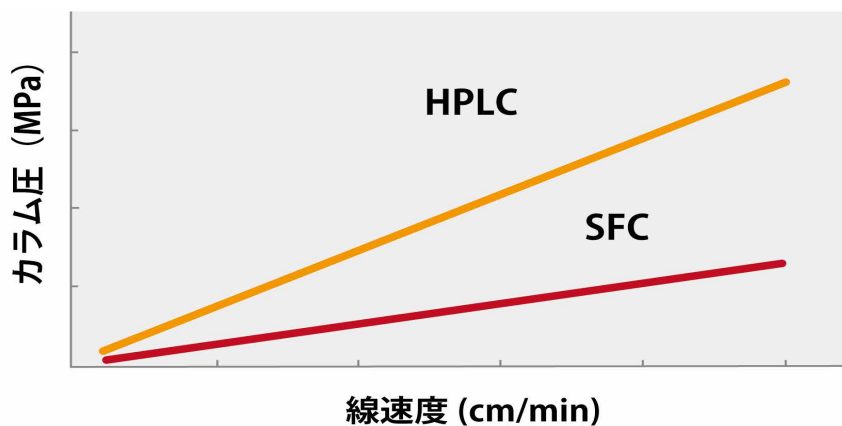


図8 線速度とカラム圧の関係

線速度が高い分析は分析時間を短縮できる一方、カラム圧が上がります。カラム圧力は使用する装置やカラムの許容圧力範囲の制限を受けるため、SFCよりも高いカラム圧がかかるHPLCではとくに制限がかかります。超臨界流体状態のCO₂は、一般的なHPLCで使用される有機溶媒や水と比較し粘度が低いです。このためHPLCとSFCで同等の分離パターンが得られる分析においても、SFCではHPLCと比較し分析時間を削減することが可能となります。

また、超臨界二酸化炭素はLCで用いられる溶媒と比較し、高い拡散係数を有します。拡散係数はクロマトグラフィーにおいては固定相と移動相の間で起こる化合物の平衡移動の速度に関与し、分離能に影響します。以下にカラムの分離能を示す理論段高(HETP)と分離に関わる物理学的なパラメーターの関係式であるvan-Deemterの式を示します。

$$HETP=A \cdot dp + \frac{B}{V} + C \cdot dp^2 \cdot V$$

A: 多流路拡散係数

B: 軸方向拡散係数

C: 物質移動係数への抵抗

V: 線速度

dp: 充填剤粒子径

HPLCとSFCにおけるvan-deemterプロットを図9に示します^{*3}。A項はカラム内の充填剤によって生じる多流路拡散に由来し、充填剤の粒子径に比例します。B項はカラム軸方向の分子拡散に由来します。この拡散は化合物が固定相や移動相に留まる間に生じる現象で、粒子径のサイズに関わらず線速度に反比例します。C項は化合物の充填剤の細孔内への浸透しやすさと線速度が寄与する物質移動拡散に由来します。物質移動拡散は粒子径の二乗と移動相の線速度に比例し、粒子径のサイズが小さく、線速度が低いとHETPが高くなります。HPLCの場合、移動相の線速度が高い場合に化合物の物質移動拡散が大きくなりますが、超臨界二酸化炭素はHPLCで用いる溶媒よりも拡散係数が高く、充填剤の細孔内へ浸透しやすいため、線速度が高くても物質移動拡散が低くなります。

このことからSFCは高い線速度でも分離能を落とすことがない、超高速分析が可能な分析手法です。

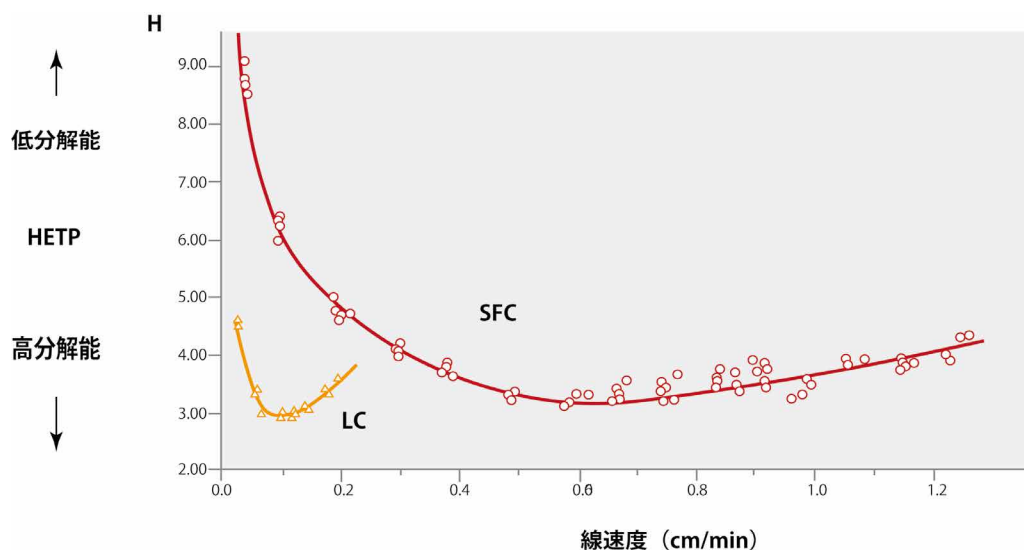


図9 LCとSFCのvan-Deemterプロットの比較

このプロットでは、SFCにおける最適な線速度の領域がHPLCよりも高い領域にあることが示されています。HPLCとSFCによるトコフェロール類の分析例の比較を図10に示します^{*4}。

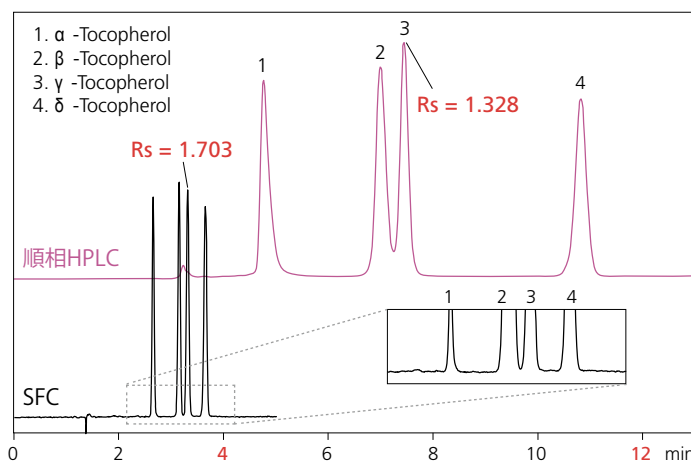


図10 HPLCとSFCによるトコフェロール類の分析例の比較

1-3-4 気化-LC-MS検出感度の向上

CO₂は、温度と圧力の条件がそろった環境で「溶媒」の状態になり、SFCではこれを移動相として用います。検出器としてMSを用いる場合、背圧制御ユニットをMSの手前に設置するため、CO₂は気化し、MSに到達するのはモディファイアーもしくはメイクアップのみです。そのため従来のLC-MS分析と異なり、移動相による希釈効果が低減されます。この結果、同じMSを使用し、LC-MSとSFC-MSで同一試料を分析した場合には感度が向上する可能性があります。400以上の化合物を分析したときに9割の化合物について感度向上が見られました(図11)。図12に10ppbに調製した成分をLC-MSとSFC-MSで測定した結果の比較を示します。

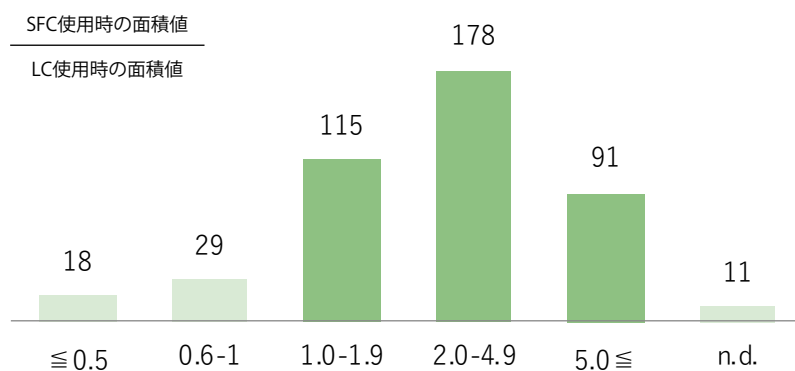


図11 LC-MSとSFC-MSの面積値比較

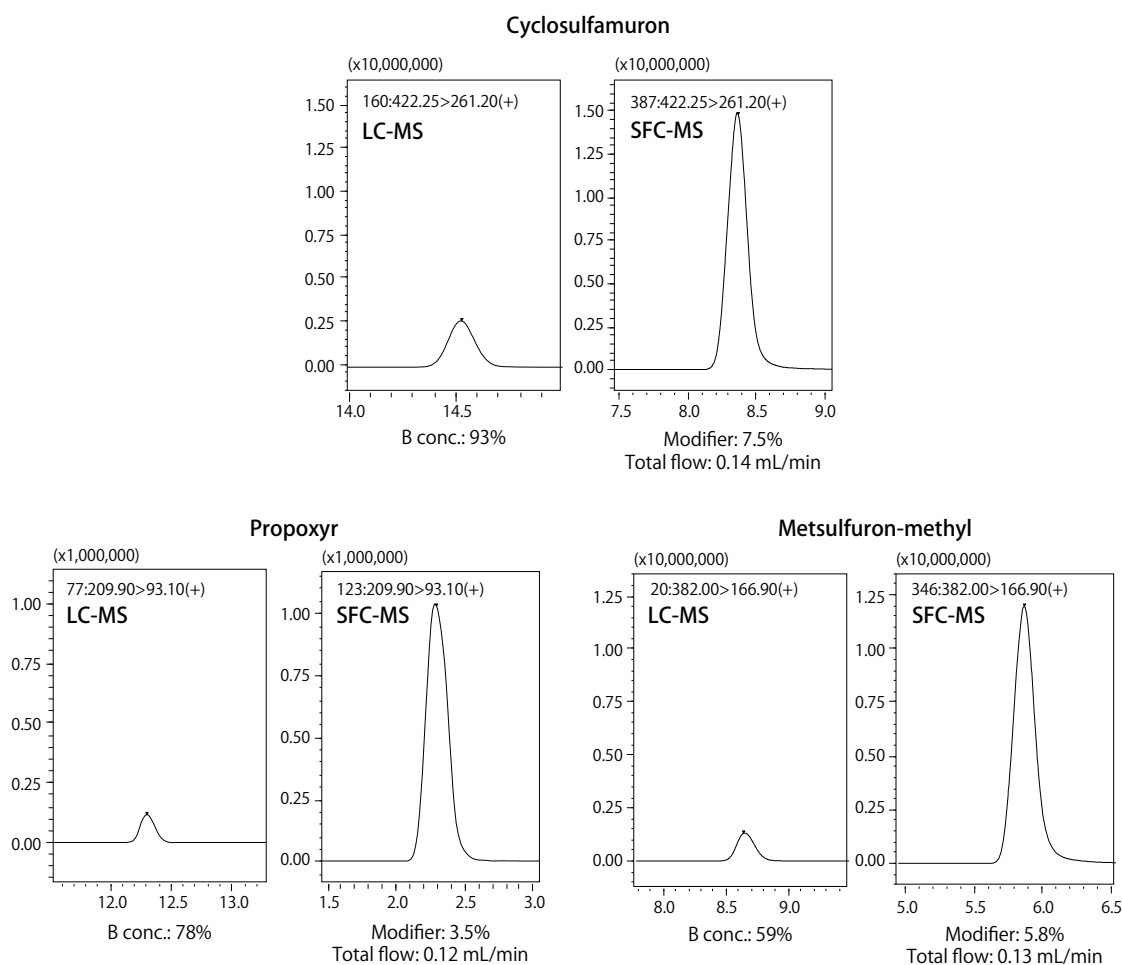


図12 LC-MSとSFC-MSによる農業混合標準溶液のマスクロマトグラムの比較

1-4 SFCによる分取

分取はGCおよびHPLCで利用されていましたが、SFCも同様に分取が可能です。

SFCの分取には以下のような利点があります。

① 分取後の後処理

超臨界二酸化炭素が常温常圧条件で気化するため後処理が不要です。

② 大量分取における溶媒コスト

安価かつ環境負荷の小さいCO₂の使用により溶媒の購入コストと廃棄コストが削減できます。

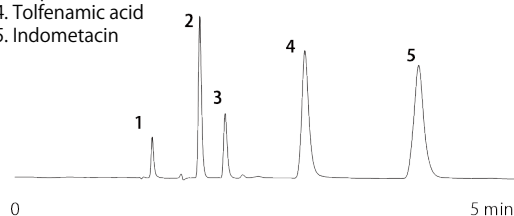
③ 分取の回収率

HPLCでは、分取後に溶媒の気化や濃縮など加熱による後処理が必要です。一方、SFCでは用いる溶媒が気化しやすいため、加熱による後処理を最低限に抑え、後処理中に成分が壊れることを防ぐことができます。

SFCを分取に使用する場合、流路内で目的化合物が析出するのを防ぐため、カラムによる分離後に、目的成分を溶解可能な有機溶媒を添加することがあります。この添加された有機溶媒、ならびに分離時に使用したモディファイアーと気化したCO₂を分離する機構が必要になります。この機構を気液分離装置と言い、各社様々な気液分離装置を開発しています。

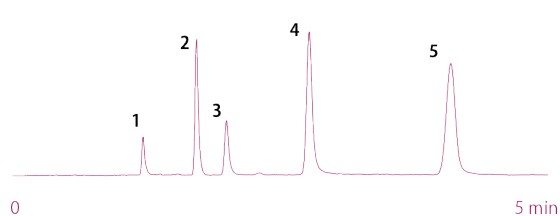
HPLCでの分取と同様に、SFCでも分析スケールでの検討後、カラムを分取サイズに、移動相の流量と試料の注入量を変更します。流量と注入量はカラム断面積に比例して増やすことで同等の分離が得られます。図13に分析スケールから分取スケールに変更した例を示します。同じ固定相のカラムを使用することにより分析スケールと同等の分離が得られていることが可能です。

1. Anisole
2. p-nitroanisole
3. Ibuprofen
4. Tolfenamic acid
5. Indometacin



分析スケール

流量 : 3 mL/min
移動相 : CO₂:MeOH=90:10
カラム : Shim-pack UC-Sil (250 mmL.×4.6 mm, 5 um)
温度 : 40 °C
圧力 : 10 MPa
注入量 : 0.1 uL



分取スケール

流量 : 60 mL/min
移動相 : CO₂:MeOH=90:10
カラム : Shim-pack UC-Sil (250 mmL.×20 mm, 5 um)
温度 : 40 °C
圧力 : 10 MPa
注入量 : 50 uL

図 13 SFCによる分析スケールから分取スケールの移行

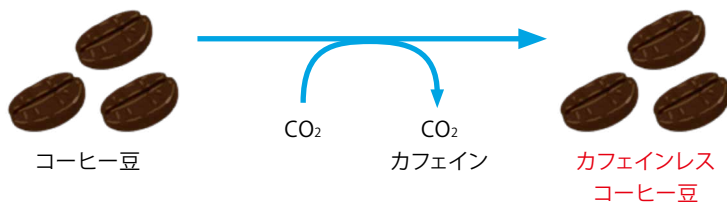
超臨界流体クロマトグラフィーに使われる超臨界二酸化炭素の代表的な活用例はカフェインレスコーヒーの製造です。以前は溶媒を用いてコーヒー豆からカフェインを除去する方法が適用されていましたが、僅かに残留した溶媒の健康影響が懸念されていました。超臨界二酸化炭素は、人体や環境への懸念がなく安全な物質であるため、今ではカフェインレスコーヒーの製造には超臨界二酸化炭素が用いられるケースが増えてきています。

超臨界二酸化炭素によるカフェインレスコーヒー製造の原理を少し紐解いてみましょう。

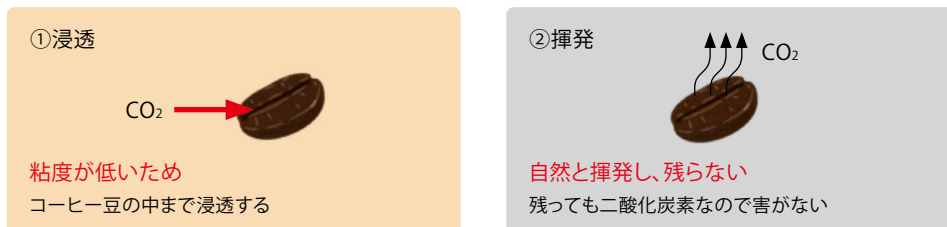
- ・特長1 浸透力が高い・・・ 水よりも浸透力が高いため、コーヒー豆の組織を容易に通過します。コーヒー豆を挽いて表面積を大きくしなくても、内部まで超臨界二酸化炭素が浸透できるのです。
- ・特長2 溶解性が高い・・・ 超臨界二酸化炭素と接触した物質は素早く溶解し、コーヒー豆の外へ抽出されます。
- ・特長3 常温大気圧下で揮発・・・ コーヒー豆中に残存しにくいです。
- ・特長4 毒性が低い・・・ もしコーヒー豆中に残存していても毒性を示すことはありません。

このように、カフェインレスコーヒーは超臨界二酸化炭素の特性を生かして製造されているのです。

二酸化炭素超臨界流体を利用したカフェインレスコーヒー



カフェイン除去の工程から見る、超臨界流体の特徴



超臨界二酸化炭素でコーヒー豆からカフェインを除去する方法は、試料内部から目的成分を抽出する「超臨界流体抽出」という技術です。従来の前処理には組織のホモジナイズ、溶解、抽出（液液抽出、固相カートリッジ）を必要としますが、超臨界流体抽出では、試料をチャンバーに入れ、そこに超臨界二酸化炭素を充填することで目的の化合物を抽出できます。また超臨界二酸化炭素で抽出した化合物はそのままカラムに導入することが可能なため、前処理から分離分析を自動で実施することが可能です。

従来法(QueChERS)の前処理



超臨界流体抽出による前処理



第2章 超臨界流体クロマトグラフ:Nexera UC

超臨界流体クロマトグラフNexera UCには、1) SFCシステム、2) UHPLC/SFC切換システム、3) 分取SFCシステム、4) オンラインSFE-SFCシステム、5) オフラインSFE前処理システムなどの製品ラインアップがあり、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。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CO₂送液ユニット(LC-30AD_{SF})と背圧制御ユニット(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。

本章では、Nexera UCおよびその拡張技術に使用する装置ユニットを紹介します。なお、SFCシステムで使用するオートサンプラーなどの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。

2-1 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。

図14にNexera UC UFMSシステムの外観を示します。



図 14 Nexera UC UFMSシステム

2-2 UHPLC/SFC切替システム:Nexera UC/s

分析条件の開発の際、UHPLCとSFCを両方使うことができれば、より幅広い分離条件の中から最適な分離条件を見出すことができます。1つのシステムでUHPLCとSFCの両方の分析モードを使用することを可能にしたシステムが、Nexera UC/sです。UHPLCとSFCを1つのシステムに統合したNexera UC/sの流路図を図15に示します。標準的なUHPLCシステムに、LC-30AD^{sf}とSFC-30Aを追加したシステム構成です。送液ユニットの切り換えと背圧制御弁の圧力制御のON/OFF設定を変更することにより、UHPLC分析とSFC分析を両立することができるため、スペースと導入コストを抑えられるとともに装置稼働率の向上が図れます。移動相溶媒切替バルブとカラムスイッチングバルブを併せて用いることにより、最大12本のカラムに対して自動的かつ連続的に移動相条件を変更することにより、網羅的な測定を可能とし、メソッド開発の効率化を実現します。

Nexera UC/sの詳細内容は、Technical Report「Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムによる分離向上とメソッド開発の効率化」をご覧ください。

また、UHPLCとSFCを切り換えずに、SFCのみで最大12本のカラムとモディファイアーのオートブレンディング機能を用いた、キラル化合物の分離に特化したキラルスクリーニングシステムもあります。本システムを使用し、キラル化合物の分離条件を検討した具体例は4章に示します。

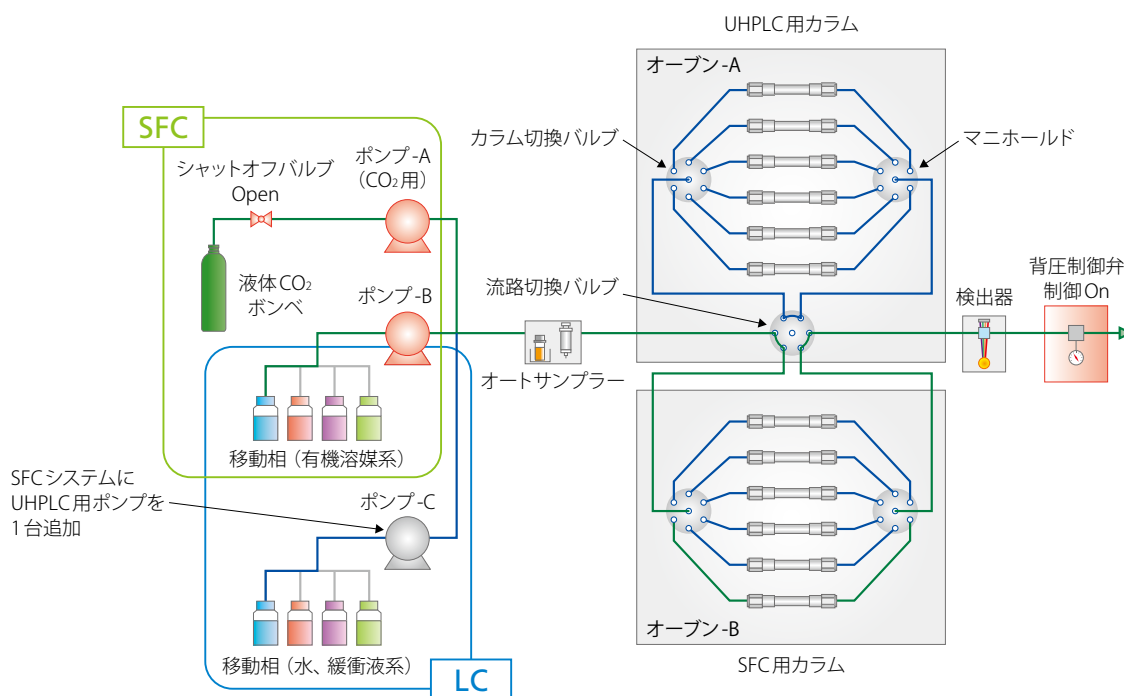


図15 Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システム流路図(緑ラインはSFC使用時)

Technical Report

Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムによる分離向上とメソッド開発の効率化

超臨界流体二酸化炭素と有機溶媒を用いたSFCはUHPLCと異なる分離選択性を示すことから、新たな分離手法として近年期待されています。

UHPLCとSFCを統合させたNexera UC/s UHPLC/SFC切替システムは、1システムでUHPLC分析とSFC分析を両立することができます。SFCはUHPLCと分離特性が異なるため、異性体間の分離の改善を期待できます。メソッド開発時にUHPLCとSFCの2種類の分離手法を用いてスクリーニングすることで、短時間でより良い分析条件を構築することが可能になります。

ここでは、Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムを用いて光学異性体の分離条件を検討した事例をご紹介します。



Technical Report >

2-3 分取SFCシステム

分取LCは目的成分を精製する手法として、化学、医薬品、食品など、分野を問わず幅広く利用されています。分取LCは対象の成分を高純度、高回収率で生成する強力なツールですが、乾燥、粉末化の工程が必要です。SFCでは分取精製後の粉末化工程の労力を大幅に削減することができ、分取ワークフローの効率化を実現します。Nexera UCの製品ラインナップには、大量分取を目的としたスタックフラクションシステム、複数ピークの分取を目的としたマルチフラクションシステム、分析スケールでの分取を目的とした分析フラクションシステムの3つがあります。

また、本製品では当社独自の気液分離セパレーター（特許取得済み）により試料の飛散やキャリーオーバーを抑制しながら高い回収率を得ることが可能です。香料のリナロールなど揮発性の高い化合物であっても、流量やモディファイアー濃度によらず、良好な回収率が得られます。以下、3つの製品ラインナップと気液分離セパレーターについて説明します。

Nexera UC Prep



Product >

2-3-1 スタックフラクションシステム

数成分程度の化合物を繰り返し注入して大量分取することに特化したシステムです（図16）。インジェクターとフラクションコレクターの機能をあわせ持つ注入回収ユニットFRS-40は、1つの試料の繰り返し注入と、グラムオーダーでの分取を担います。最大で20 mL*まで注入することができ、10本の回収を行うことができます。10～150 mL/minの流量に対応し、10～30 mm内径のカラムの接続が可能です。本システムの詳しい内容は、Technical Report「スタックインジェクションを活用した分取超臨界流体クロマトグラフィーによる異性体の分取業務効率化」をご覧ください。

*オプション使用時



図 16 Nexera UC Prep スタックフラクションシステム

2-3-2 マルチフラクションシステム

医薬品の不純物など多数のピークが検出される試料中の各成分を分取する用途に適したシステムです（図17）。注入はオートサンプラーで行い、最大2 mL*まで注入でき、162試料（1.5 mL バイアル使用時）をセットできます。フラクションコレクターFRC-40 SFは、540本（10 mL バイアル使用時）までの分画を可能にします。10～150 mL/minの流量に対応し、10～30 mm内径のカラムの接続が可能です。

*オプション使用時



図 17 Nexera UC Prep マルチフラクションシステム

2-3-3 分析フラクションシステム

合成確認などの目的で数mg程度の分画量で十分な場合に、分析スケールでの分取を実現するシステムです。Nexera UCにフラクションコレクターFRC-40 SFを接続して、メソッドスカウティングによる分析条件検討から数mgオーダーの少量分取までを、同じシステムで実現できます。

流量は最大5 mL/minで、分析サイズのカラムの使用が可能です。



図 18 Nexera UC 分析フラクションシステム

2-3-4 気液分離セパレーター: LotusStream™

SFCを用いた分取時は、CO₂が超臨界状態から気体状態になる時に、一気に約500倍の体積に膨張することで起こるカラムからの溶出液の飛散が回収率の低下の一因となっていました。

新規開発の気液セパレーター“LotusStream” (特許取得済) は、多流路分岐方式によって管径を広げることなく流速を抑制します。これにより溶出液の飛散を起こすことなく、CO₂は外へ、液体は柱を伝って真下に滴下されます (図19)。LotusStream技術についての詳細は、Technical Report「分取超臨界流体クロマトグラフィー用気液分離機構LotusStreamの性能評価」をご覧ください。



Movies >



図 19 LotusStream使用時・未使用時の気液分離の様子

Technical Report

分取超臨界流体クロマトグラフィー用気液分離機構 LotusStreamの性能評価

超臨界流体を用いる分取SFCは最も良く用いられる分取精製技術の一つですが、分取LCとは異なり、回収時にCO₂と液体を適切に分離しないと液体が飛散して回収率の低下を招くという課題がありました。本レポートでは分取超臨界流体クロマトグラフシステムNexera UC Prep 用に新規開発された気液セパレーター “LotusStreamセパレーター” を用いて回収率・キャリアーオーバー・コンタミネーションの確認を行った事例をご紹介します。



Technical Report >

2-4 オンラインSFE-SFCシステム

オンラインSFE-SFCは、超臨界流体抽出 (SFE: Supercritical Fluid Extraction) により抽出した成分を直接カラムに導入し、SFCで分離を行う抽出分離技術です。図20に流路図と抽出から分析までのフローをに示します。SFEユニット内のバルブを用いて流路を切り換え、抽出容器に超臨界二酸化炭素を導入後、通液せずに静置する静的抽出 (Static extraction) と、抽出容器に通液して抽出物を取り出す動的抽出 (Dynamic extraction) があります。オンラインSFE-SFCでは、動的抽出時に分析カラムへ試料が導入されることになります。オンラインSFE-SFCの原理の詳細な内容は、Technical Report「オンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー (online SFE-SFC)」をご覧ください。

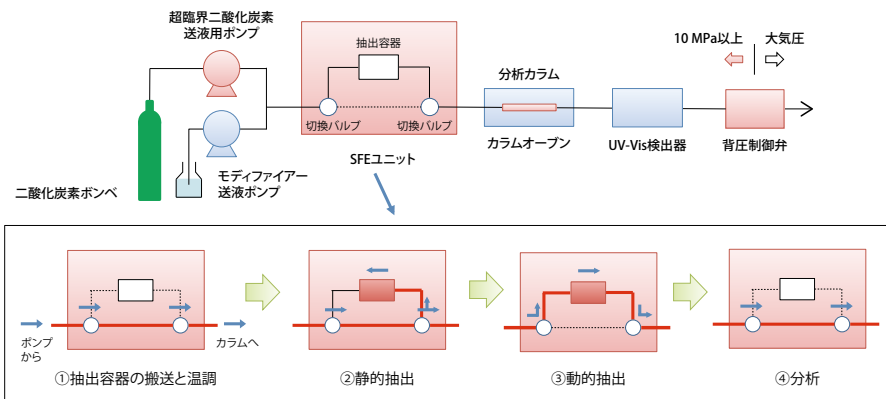


図 20 Nexera UC オンラインSFE-SFC-MSシステム流路図

オンラインSFE-SFCは抽出から分離検出までの流れを装置内で完結させることができるため、煩雑な前処理操作を行う必要がなく、かつ自動化が可能であり、分析に関する種々の操作を大幅に軽減することができます。また、抽出から分離・検出までを無光・非酸化・無水環境下において実施することができるため、光分解しやすい成分、酸化されやすい成分や加水分解しやすい成分など不安定な化合物分析に非常に有効です。またオフラインSFEの場合のように試料を溶液で調製する必要がなく試料溶媒によって目的成分が希釈されることがないため、容易に高感度化することが可能です。図21にオンライン-SFE-SFCと溶媒抽出-SFCによる還元型コエンザイムQ10の分析例の比較を示します。この分析の詳細な内容は、Application News No. L496A「オンラインSFE-SFCの不安定な化合物の分析への応用」をご覧ください。

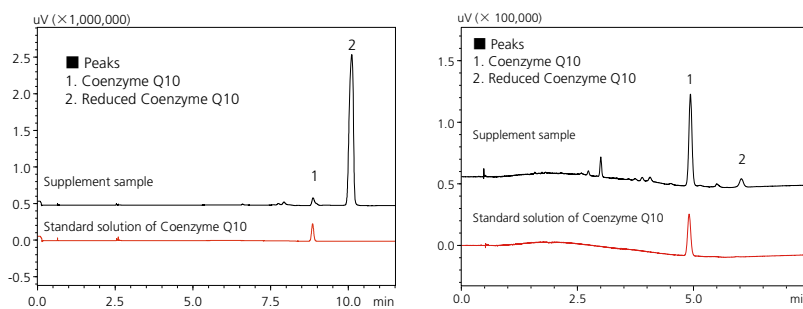


図 21 還元型コエンザイムQ10の分析例 (左: オンライン-SFE-SFC、右: 溶媒抽出-SFC)

Technical Report

オンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー

超臨界流体を抽出媒体として用いた超臨界流体抽出 (SFE)、移動相として用いた超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)、これらを直接接続するオンライン SFE-SFCシステムについてご紹介します。



Technical Report >

Application News

オンライン SFE-SFC の不安定な化合物の分析への応用

還元型コエンザイム Q10は容易に酸化され、酸化型コエンザイム Q10に変化します。ここでは、サプリメント中に含まれる還元型コエンザイム Q10 の分析を溶媒抽出-SFC 分析とオンライン-SFE-SFC 分析の両方で得た結果を比較します。



Application >

従来の溶媒抽出による前処理法では、試料に溶媒を添加して抽出を行うため、抽出物は抽出溶媒で希釈され抽出液中の化合物濃度は低下します。さらに、分析スケールの条件では、カラム内径が小さいため抽出液の数 μL しか導入することができません。そのため抽出物の含有量が少ない試料を分析する場合、感度が足りず、繰り返し抽出操作や濃縮操作などが必要になります。一方、Nexera UC オンラインSFE-SFCシステムでは、抽出物を直接カラムに導入することができるため、カラムへの試料導入量は溶媒抽出と比較して非常に大きくすることができます。比較例*を図22に示します。Nexera UCで直接試料を導入した場合、溶媒抽出で溶媒を10 mL使用し1 μL インジェクションした場合と比較すると、カラムへの導入量は10000倍になり高感度分析が可能になります。

*抽出効率が同等であり、試料中の目的化合物が1%を想定

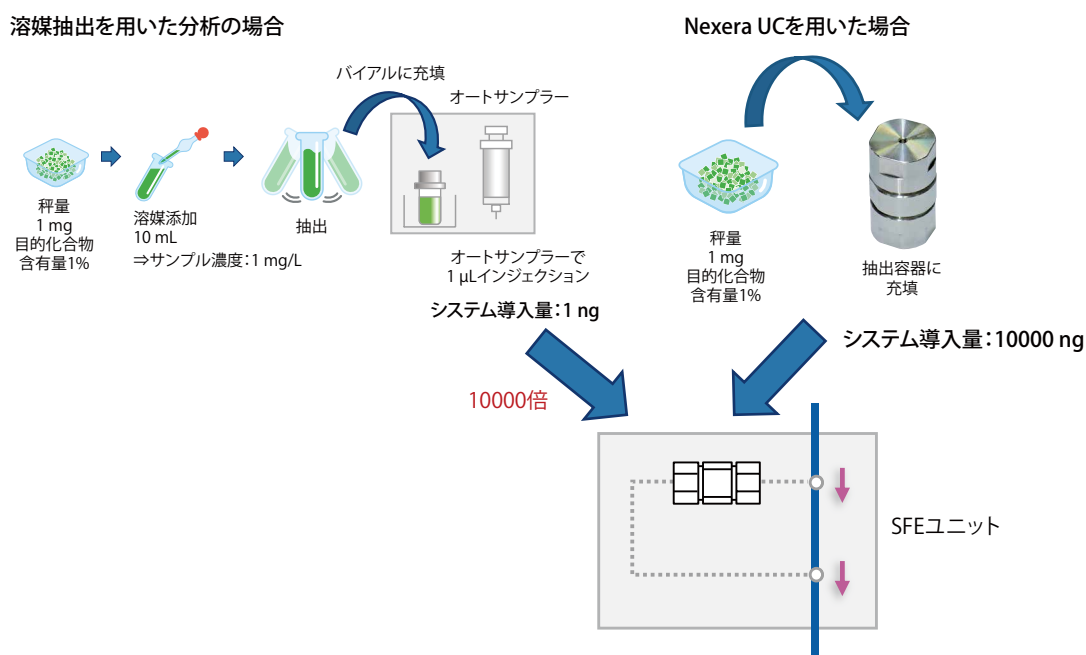


図 22 オンラインSFE-SFC-MSシステムによる高感度抽出分析

食品中の残留農薬の分析では、規制対象となる農薬の数が多いだけでなく検査時の時間短縮のため、試料の前処理も含め農薬の迅速かつ簡便な手法が求められます。オンラインSFE-SFCシステム適用の場合、前処理は脱水剤と試料を混合し、抽出容器に充填する作業のみです。オンラインSFE-SFC-MSで分析した農薬分析結果を表3に示します。親水性を示すLogPow-1.4の化合物から疎水性を示すLogPow 6.9の化合物まで幅広い極性を示す農薬への適用ができます。

表 3 オンラインSFE-SFC-MSシステムによる農薬分析の再現性と直線性

Compounds	LogP _{ow}	Repeatability (%RSD, n=5)	Range (ng/g)	R ²	Compounds	LogP _{ow}	Repeatability (%RSD, n=5)	Range (ng/g)	R ²
Ethofenprox	6.9	6.1	1-100	0.9991	Imazosulfuron	1.6	6.2	1-100	0.9998
Hexaflumuron	5.68	6.8	1-100	0.9992	Bensulfuron methyl	0.79	8.1	1-100	0.9996
Benzofenep	4.69	1.4	2-200	0.9990	Primisulfuron methyl	0.2	5.5	1-100	0.9994
Mepronil	3.66	4.6	1-100	0.9993	Halosulfuron methyl	-0.02	5.5	1-100	0.9996
Prometryn	3.34	2.7	1-100	0.9994	Azimsulfuron	-1.4	4.2	1-100	0.9998
Fenamidone	2.8	3.0	2-200	0.9991					
Ethlychlozate	2.5	3.0	1-100	0.9996					

2-5 オフラインSFE-SFC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。図20に抽出のフローを示します。試料を充てんした抽出容器をSFEユニットにセットし、(図23A) 抽出容器内を超臨界二酸化炭素で満たした後は、静的抽出し(図23B) 抽出容器内を超臨界二酸化炭素で通液しながら動的抽出します(図23C)。抽出物をトラップカラムによってトラップし、目的成分を含む溶出液をフラクションコレクターにて回収(図23D)、これをLC-MSやGC-MS、FTIRなどの所定の分析機器で測定するという手法です。オフラインSFE前処理システムの原理の詳細な内容は、Technical Report「オフライン超臨界流体抽出による前処理の効率化」をご覧ください。

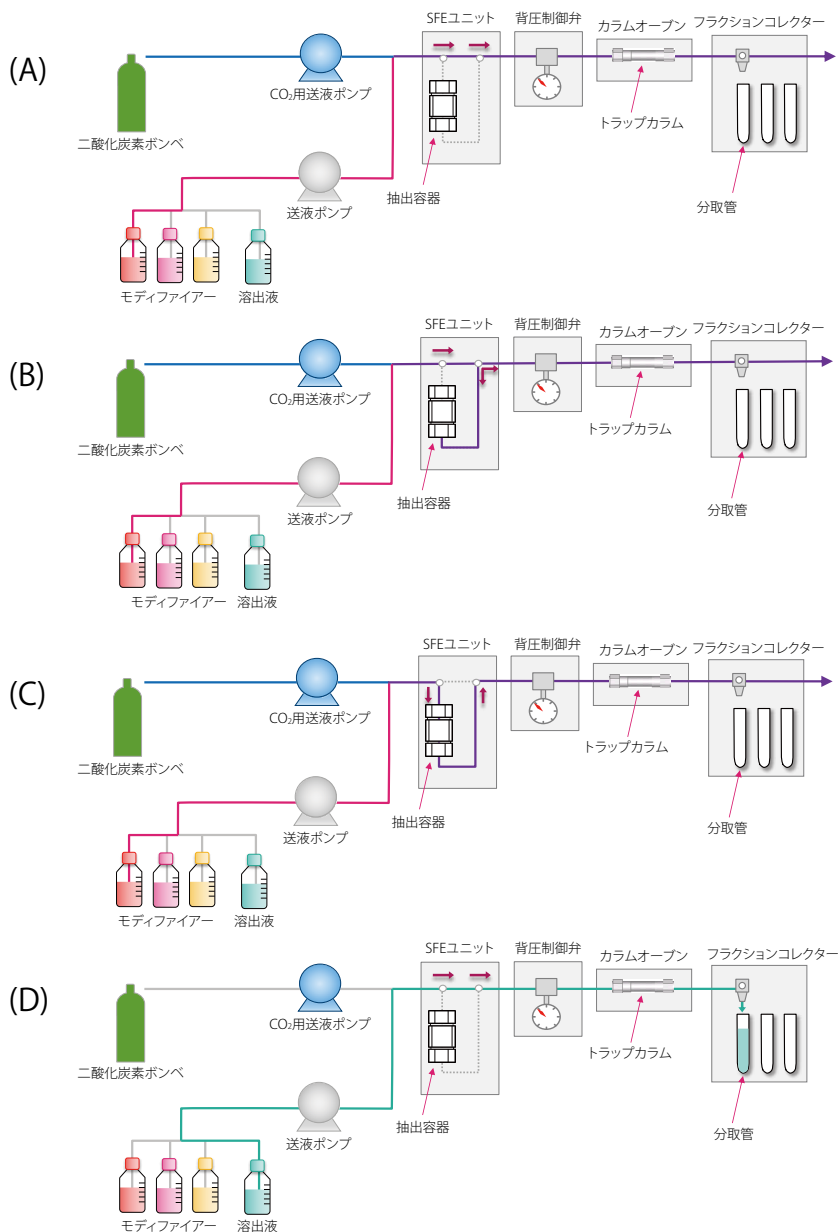


図 23 Nexera UC オフラインSFE前処理システムの抽出の流れ

Technical Report

オフライン超臨界流体抽出による前処理の効率化

一般的に固体試料の抽出は溶解法や固液抽出法などが用いられますが、抽出に時間を要し、抽出器などの洗浄・準備など抽出操作以外でも手間がかかるため多検体処理に適していません。一方、超臨界流体による抽出法は、超臨界流体の高い溶解性や浸透性などの特長により、固体から目的成分を高い効率で抽出することが可能で、かつ抽出操作を自動化することができます。ここではオフライン超臨界流体抽出を実施するための前処理専用システム“Nexera UC SFE 前処理システム”を用いた分析前処理の効率化についてご紹介します。



Technical Report >

第3章 SFC分析条件のパラメータ

SFCによる分析条件の開発の考え方は、基本的にHPLCでの分析条件の検討のプロセスと凡そ同じです。HPLCの分析での対象成分は、移動相に溶解できる化合物がとて考えられますが、SFC分析では超臨界二酸化炭素と相溶性のある有機溶媒と可溶性化合物であればSFC分析を実施することが可能です。

定量を目的としてクロマトグラフィーを用いる際、最適な分析条件として達成しておくべき条件は分離度が1.5以上であることです。以下に分離度Rsに関する基本式を記します。

$$R_s = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \cdot \frac{k'}{1+k'} \cdot \sqrt{N}$$

α : 分離係数

k' : 保持係数

N : 理論段数

Rsに影響する α 、 k 、 N は、いずれも使用するカラムと移動相の組み合わせによって変動し、独立している係数で、このうち N は分離効率を、 α は選択性を意味し、これらの数値を増加させることにより、分離が改善します。

SFCでは、超臨界二酸化炭素の物性がHPLCの移動相溶媒とは異なるため、HPLCで使用した同じカラムをSFCで用いると異なる溶出挙動を示すことがあります(図24)。本章では、SFC分析での条件検討に関わるカラムや移動相の特徴について説明します。SFCの分析条件検討における各種パラメータの影響について実例に基づいた詳細な説明については、Technical Report超臨界流体クロマトグラフィーを用いた蛍光物質の異性体分離～分離に影響を与えるパラメータ～をご参照ください。

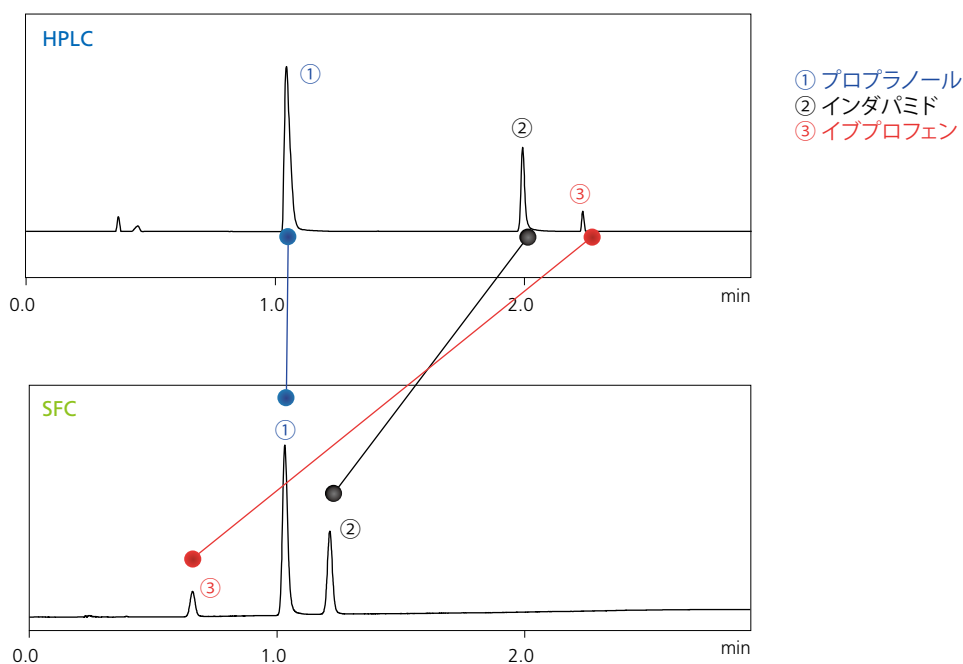


図 24 3種の医薬品成分の分離(上段 HPLC、下段 SFC)

Technical Report

超臨界流体クロマトグラフィーを用いた蛍光物質の異性体分離 ～分離に影響を与えるパラメータ～

ヒト患者体内の微小がん部位を短時間で検出するために、がん部位選択的なバイオマーカー酵素と反応することで初めて蛍光を発する分子である蛍光プローブの研究・開発が行われています。蛍光プローブの母核として汎用されているローダミンやフルオレセインは、典型的な方法で置換基が導入された分子を合成すると、ベンゼン環部位の置換位置が異なる異性体が生成されます。蛍光プローブの母核として使用するためには、これらの異性体を分離することが重要です。超臨界流体クロマトグラフ Nexera UC を用いて、蛍光物質のカルボキシテトラメチルローダミンの異性体分離の最適化を行いました。異性体の分離に影響を及ぼす要因についてご紹介します。



Technical Report >

3-1 SFCで使用されるカラム

SFCの分析に、HPLCで使用されている様々なカラムを使用することは原理的には可能ですが、SFCではCO₂を超臨界流体状態に保つため、一定の圧力が常にかかっている点で使用するカラムの耐圧を確認しましょう。また、ポリマー系カラムは固定相が膨張し圧力が上昇するため、使用時には注意が必要です。

超臨界二酸化炭素がヘキサンと同程度の極性を有しているため、SFCの主な分離モードが順相クロマトグラフィーに近い挙動を示すと考えられていますが、HPLCとは異なり、順相モード(シリカ、ジオール、CNなど)と逆相モード(C18、コレステリル、フェニルなど)の両方の性質のカラムを使用することができます。またSFCで使用する超臨界二酸化炭素は移動相の拡散性が高く、分子密度が低いいため、HPLCよりも副次的な相互作用を受けやすく、カラムの固定相の種類によって分離の挙動が大きく変化します^{*5}。そのため最適な条件を得るためには、さまざまな種類の固定相を用いて分析条件を検討することが重要です。

前述の通り、超臨界二酸化炭素はヘキサンと同等の低極性ですが、高極性溶媒とも混和できるため、SFCの移動相と固定相の最適化の際に、移動相およびモディファイアの種類・組成を変えずにカラムを順相から逆相に置き換えることが可能です。図25にHPLCとSFCの溶出順の比較を示します。HPLCでは、逆相・順相のそれぞれの分離モードでは使用する移動相の物性が対になっているため、分離モードを変えるために装置内の溶媒を置換する作業が出てきますが、SFCでは逆相・順相のどちらの分離モードでも移動相条件が同じであるため、カラムの交換のみで分離の様子を確認することができます。

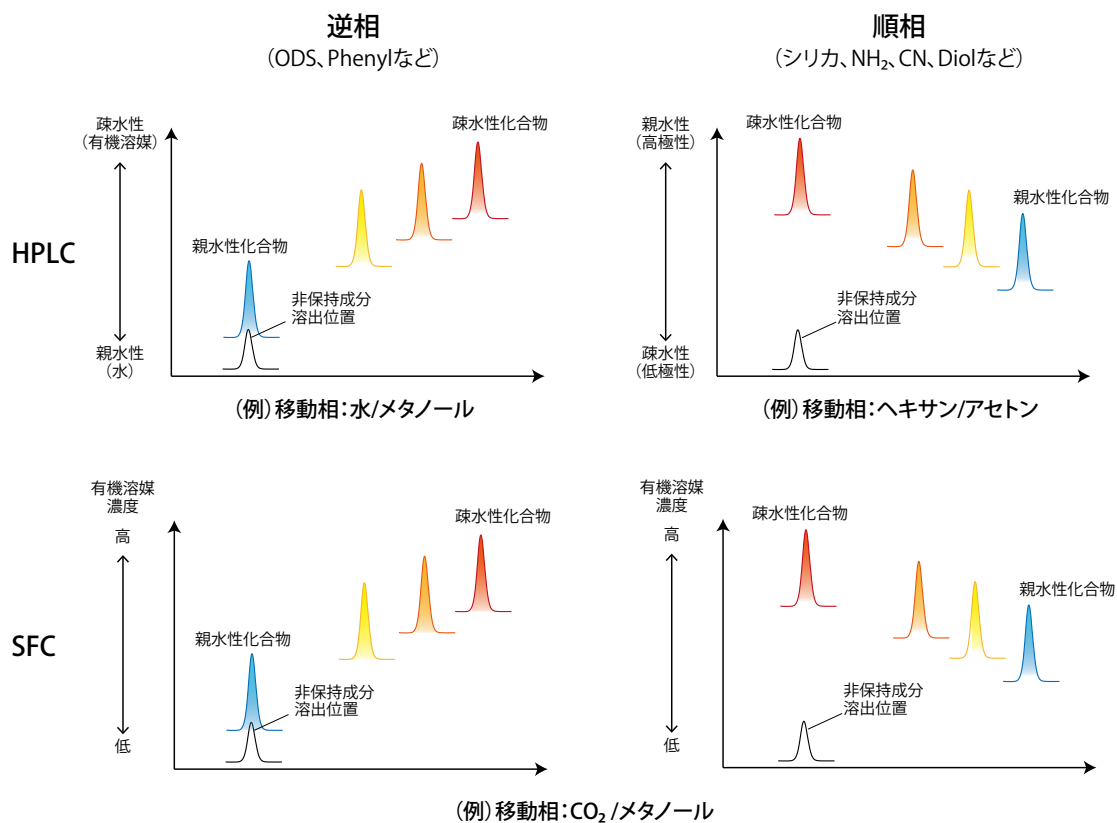


図 25 HPLCとSFCの溶出順比較

3-1-1 カラムの選択

SFCの主な分離モードが順相であるため、順相系のUC-Diol/UC-Diol IIがファーストチョイスとして広く使われています。エチルピリジン系カラムと類似した挙動を持つUC-Pyがそれに続きます。HPLCでは逆相分析と順相分析で、それぞれ使用する移動相が水系と非水系というように組成が大きく異なりますが、SFCでは固定相によらず、移動相は超臨界流体二酸化炭素とモディファイアー(メタノールのような水溶性有機溶媒)の混合液が使用されるため、同一の移動相組成ですべてのカラムを連続して分析することができます。

また超臨界二酸化炭素は細孔内へ浸透しやすいため、固定相との相互作用を促し、異性体やHPLCで分離が難しい化合物を、SFCで分離できる可能性があります。とくに特異的または複数の相互作用が働くカラムは、分離改善に影響します。

図26にイブuproフェン(酸性化合物)、インダバミド(中性化合物)、プロプラノロール(塩基性化合物)を様々なカラムを用いて分析したときの保持挙動と溶出順序のインデックス、図27にジオール基、ヒドロキシフェニル基、コレステリル基のカラムを用いたときのクロマトグラムを示します。

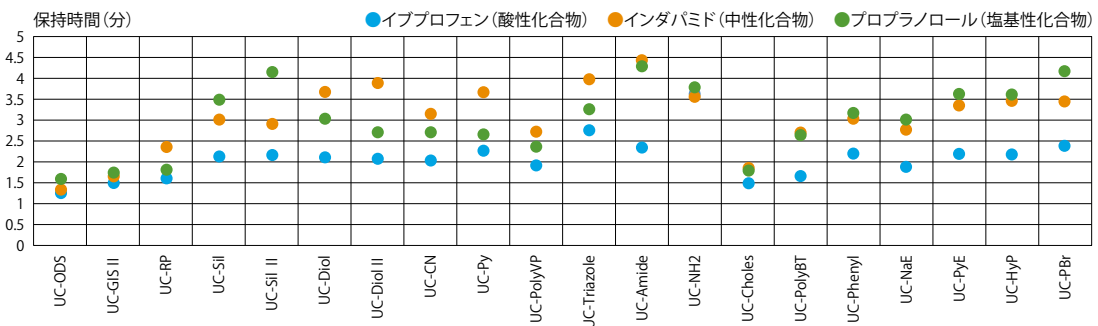


図 26 Shim-pack UCシリーズ各製品での保持挙動

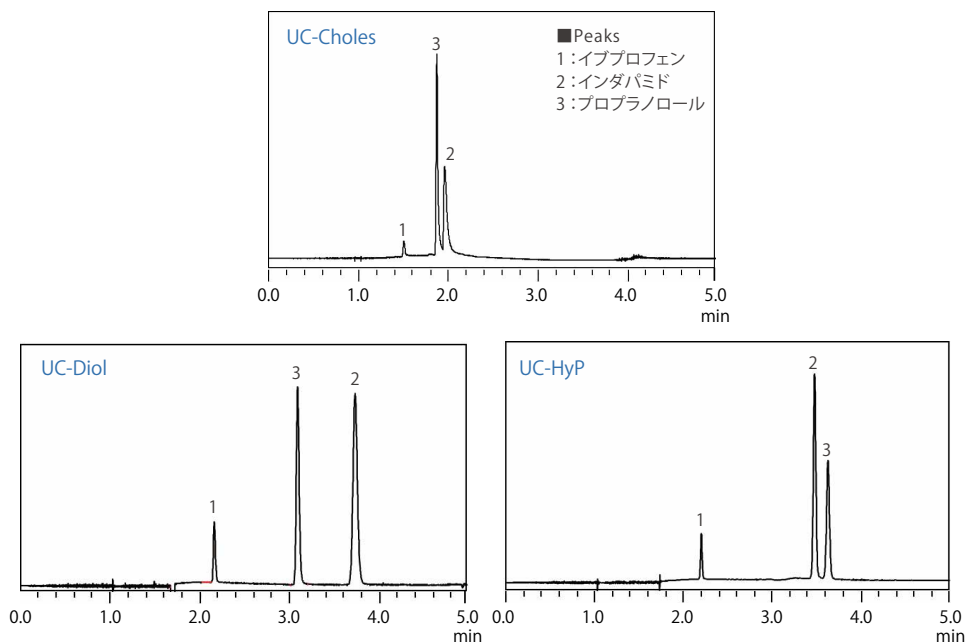


図 27 各固定相による保持挙動の違い(Diol: 順相 HyP: 順相+静電的相互作用 Choles: 疎水的相互作用)

3-1-2 Shim-pack™ UCシリーズ

島津製作所製SFC専用カラムに、Shim-pack UCシリーズを販売しています。Shim-pack UCシリーズのラインアップを表4に示します。

Shim-pack UCシリーズについての詳細はカタログ(C190-0422)をご覧ください。

また、メソッド開発におけるカラムスカウティングでは分離選択性の異なる「6本カラムセット」が有効です(図28)。

Shim-pack UCシリーズ



Product >

表4 Shim-pack UCシリーズ

カラム	炭素含有量	表面積	細孔径	官能基
Shim-pack UC RP	9%	450 m ² /g	10 nm	(Polar Embedded) Octadecyl group
Shim-pack UC GIS II	11%			Octadecyl group
Shim-pack UC Phenyl	9.5%			Phenyl group
Shim-pack UC CN	14%			Cyanopropyl group
Shim-pack UC Diol	20%			Diol group
Shim-pack UC Sil	-			(Unmodified silica)
Shim-pack UC Amide	18%			Carbamoyl group
Shim-pack UC NH ₂	8%			Aminopropyl group
Shim-pack UC-ODS	16%			3 μm : 340 m ² /g 5 μm : 300 m ² /g
Shim-pack UC Diol II	N.D.	Diol group		
Shim-pack UC Sil II	-	(Unmodified silica)		
Shim-pack UC Choles	20%	Cholesteryl Group		
Shim-pack UC PBr	8%	Pentabromobenzyl Group		
Shim-pack UC PyE	18%	Pyrenylethyl Group		
Shim-pack UC HyP	N.D.	3-Hydroxyphenyl Group		
Shim-pack UC Py		Pyridinyl Group		
Shim-pack UC Triazole		Triazolyl group		
Shim-pack UC-NaE	11%	Naphtylethyl group		
Shim-pack UC-PolyBT	N.D.	N.D.	N.D.	Polybutylene terephthalate (coated on silica gel)
Shim-pack UC-PolyVP				Poly(4-vinylpyridine) group

		6本カラムセット					
		UC-ODS	UC-Sil II	UC-Diol II	UC-PolyVP	UC-PolyBT	UC-PBr
Chemistry							
Features		分離モードは逆相系。疎水性作用により保持。	塩基性化合物の保持・立体構造の認識に優れる。	分離モードは順相系。非特異的相互作用を抑制。	酸塩基無添加条件でも良好なピーク形状を発揮。	π-π相互作用により、芳香族化合物の認識性に優れる。	ODSでは保持が小さい化合物の分離を改善。

図28 Shim-pack UCシリーズ 6本カラムセット

3-2 SFCの移動相

HPLCでの移動相の最適化には、使用する溶媒の他、酸や塩、イオンペア試薬などの改質剤の添加が分離に寄与するため、これらの項目についての検討が必要です。SFCでは、モディファイアーの量と種類、またモディファイアーに添加する酸などの添加剤、CO₂が「流体」の状態を保持させるためにかけている圧力や温度が分離に影響します。一般的にSFCの移動相にはCO₂が用いられますが、超臨界状態のフルオロフラム (CHF₃) を用いた事例もあります^{※6}

3-2-1 モディファイアー

超臨界二酸化炭素は非極性であるため、移動相に極性を持たせるためにメタノール、エタノール、アセトニトリルなどのモディファイアーを添加します。モディファイアーの量が増えるとCO₂の超臨界流体の状態は崩れ、亜臨界状態や液体に変化していることも考えられます。しかし、いずれの状態も移動相として機能することが出来るため、クロマトグラフィーは問題なく成立します。モディファイアーの添加により超臨界二酸化炭素を維持するための臨界温度、臨界圧力が上がるため、モディファイアーを高比率で添加することは望ましくありません。HPLCでは、逆相クロマトグラフィーと順相クロマトグラフィーが対称的な性質であるため、移動相に使用する溶媒の溶出力の強弱もまた拮抗します。SFCでは、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィーのどちらでも超臨界二酸化炭素は常に溶出力が弱い溶媒、モディファイアーは溶出力が強い溶媒になります。表5にモディファイアーに使用する溶媒の例を示します。また、図28に種類の異なるモディファイアーを用いて分離したクロマトグラムの比較を示します。

表5 モディファイアーに使用する溶媒例

溶媒	Log P _{ow}	溶媒	Log P _{ow}
ヘキサン	3.9	アセトン	-0.24
トルエン	2.69	ジオキサン	-0.27
テトラヒドロフラン	0.47	エタノール	-0.32
1-プロパノール	0.329	アセトニトリル	-0.34
2-プロパノール	0.05	メタノール	-0.82

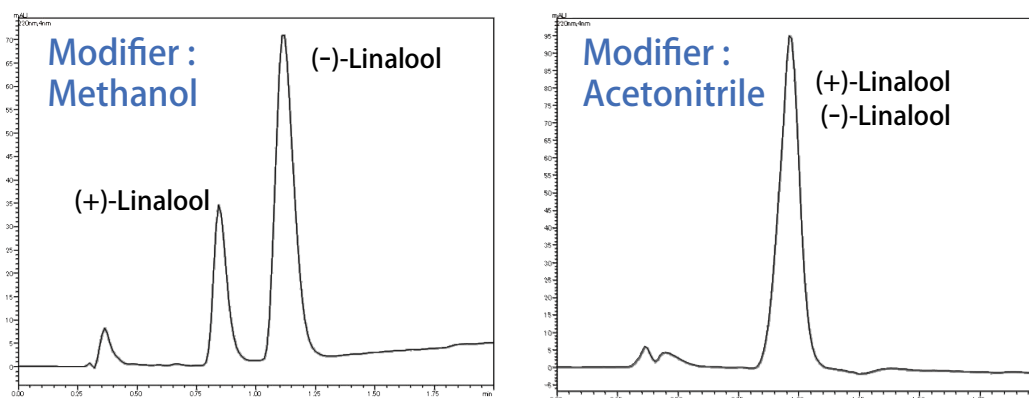


図29 モディファイアーの比較

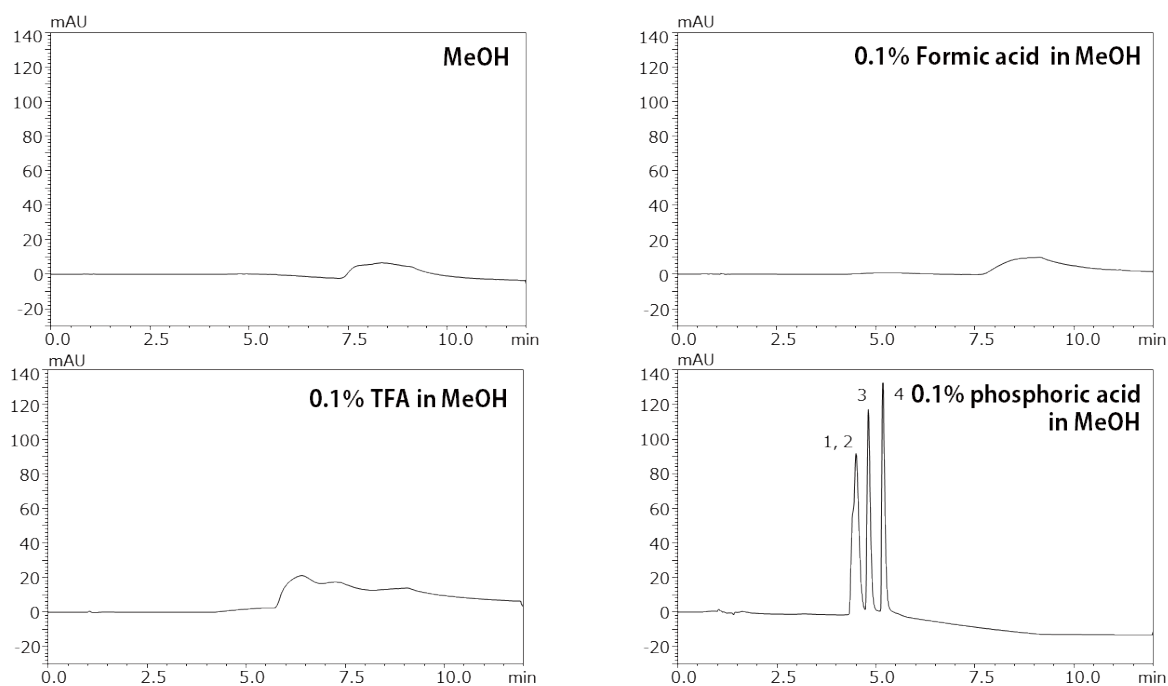
3-2-2 添加剤による分離調整、ピーク形状の改善

HPLCによる分析では、分離選択性を変えること、ピーク形状の改善を目的として、緩衝液やイオンペア試薬などの添加剤を使用しますが、SFCにおいても同様の目的で添加剤を使用します。

SFCに用いる添加剤は、超臨界二酸化炭素ではなくモディファイアーに添加して用います。主に用いる添加剤を表6に示します。酢酸などの酸や、アミン類などの塩基の添加により、対象成分のイオン化の抑制または固定相の副次的な官能基のマスキングにより、ピーク形状の改善効果が得られます(図30)。LC-MS検出の場合、イオンサプレッションが生じるため、酢酸アンモニウムなどの揮発性塩類を使用することが多いです。また、少量の水を添加することにより超臨界二酸化炭素が一部イオン化し、酸性添加剤のように振る舞うことが報告されています。^{*7}

表6 添加剤と使用する化合物の例

酸	酢酸、ギ酸、 トリフルオロ酢酸、くえん酸	イオンペア試薬	アルキルスルホン酸塩 テトラブチルアンモニウム塩
塩基	トリエチルアミン	揮発性塩	酢酸アンモニウム ギ酸アンモニウム
その他	水		



■ Peaks

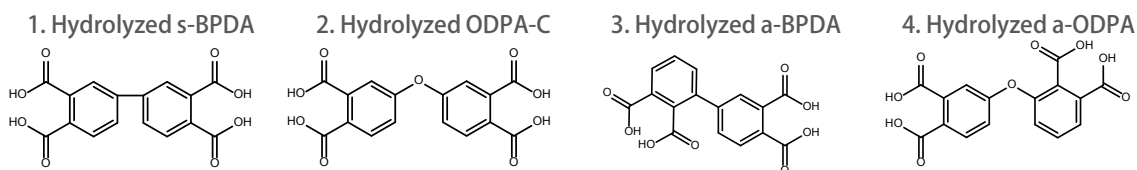


図30 モディファイアーに添加する塩や酸の種類がピーク形状に与える影響

3-2-3 その他分離に影響するファクター

HPLCでは、カラム温度が分離に与える影響はわずかでしたが、SFCでは、温度と圧力がCO₂の状態変化に影響し、それによってCO₂の密度や拡散係数などの性質が変わることから、温度と圧力の設定値も分離に影響するファクターになり得ます(図31)。

1-3-3.において、Van-Deemterの式について説明したように、拡散係数の高い超臨界二酸化炭素は、他の物質へ浸透しやすいため、物質移動拡散に関連するC項の値が低くなり、分離効率を上げることができます。温度を上げることにより、拡散係数を高め、また粘性も低下することから、長いカラムの使用と、高流量で測定することが可能になります。温度と圧力は主に理論段数に関与しますが、理論段数は分離度に平方根で寄与するため、モディファイアーや固定相のように分離の選択性に寄与するパラメータに比べて影響度は大きくありません。

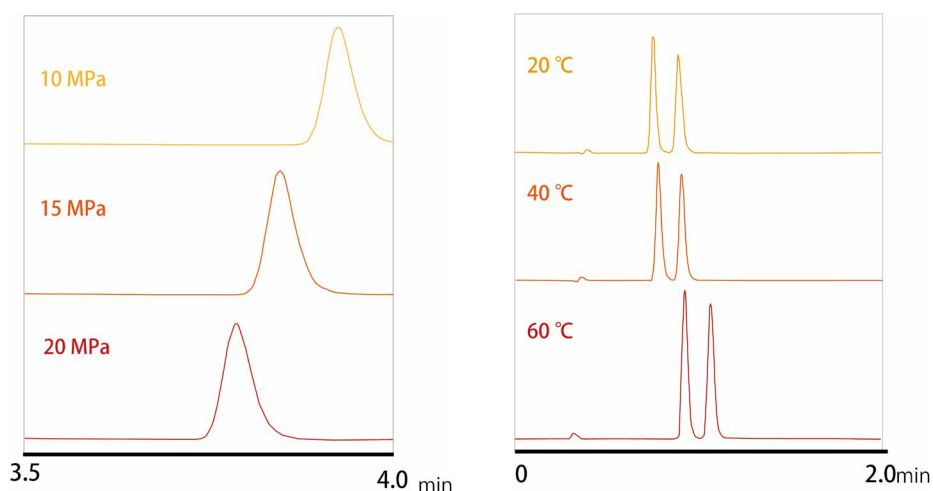


図 31 SFC分析における圧力と温度が与える影響

3-3 SFCメソッド開発をサポート:メソッドスカウティングシステム

通常のHPLCやSFCでは、分析条件の最適化には手動による溶液調製やカラム交換、グラジエントプロフィールの設定が必要のため、分離条件の探索には多くの時間を要します。特にSFCは通常のHPLCと比較し保持様式を予測することが困難であるため、網羅的に分離条件を探索します。

分離条件の最適化の段階では、溶媒や添加剤の種類や濃度を変えて保持挙動を確認する作業が必要で、モディファイアーの調製には手間がかかり、不要になった溶液の廃棄量が増えることが多いです。

前述のNexera UC/sには、カラムおよび移動相・モディファイアーを自動で切り換えるバルブが内蔵されており(図13)、また、移動相ブレンディング機能によって溶媒の種類や添加剤の種類や濃度を変え、また複数の分離モードのカラムをバルブで切り換えることによって、分離条件を網羅的に探索することが可能です。図32にモディファイアーを自動調製する移動相ブレンディングの様子を示します。

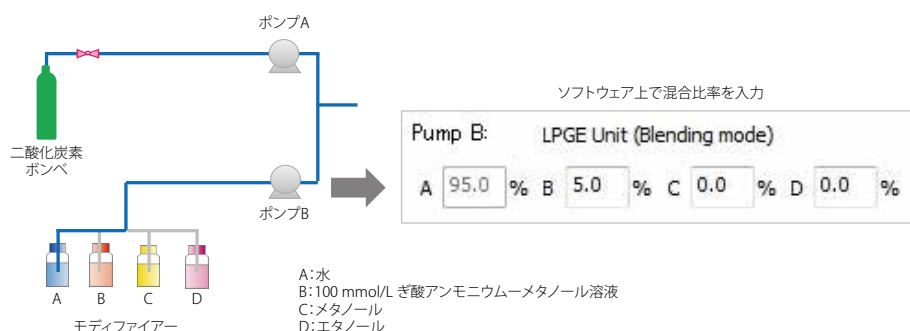


図32 SFC分析における圧力と温度が与える影響

専用ソフトウェアのMethod Scouting Solutionによって、複数の分析条件について網羅的に分離条件を探索することが可能です(図33)。得られたクロマトグラムについて、オプションソフトウェアで分離評価し、最適条件の順位をつけることができます(図34)。本ソフトでは基準(この場合1.5)以上の分離度を示すクロマトグラムを自動判断して分離度の順位付けします。なお、Nexera UC/sによる分離条件の最適化に関する詳しい内容は、Technical Report「Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムによる分離向上とメソッド開発の効率化」をご覧ください。

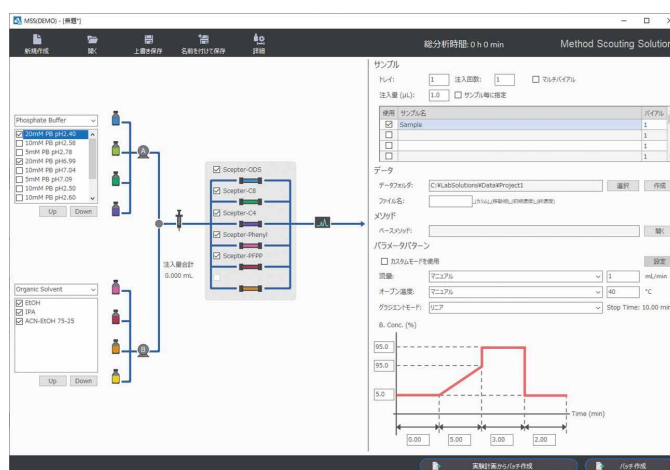


図33 Nexera UC/s 用 Method Scouting Solutionの操作画面

順位	Run No.	分析条件	評価基準を満たす分離度	分離係数	シンメトリ係数	ピーク1	ピーク2	ピーク1	ピーク2	面積%	ピーク1	ピーク2	ピーク検出数
1	32	オメガラソール_OZ-3_MeOH_20_40	7.965	1.921	1.16	1.159	6.583	12.644	49.829	50.171	2		2
2	17	オメガラソール_IC-3_MeOH_20_40	5.587	1.602	1.387	1.274	8.078	12.937	49.971	50.029	2		2
3	16	オメガラソール_IC-3_EtOH_20_40	5.382	1.639	1.915	1.661	8.617	14.124	49.984	50.016	2		2
4	31	オメガラソール_OZ-3_EtOH_20_40	5.377	1.599	1.169	1.162	7.229	11.561	49.778	50.222	2		2
5	1	オメガラソール_AD-3_EtOH_20_40	3.996	1.509	1.257	1.404	8.779	13.25	50.054	49.946	2		2
6	8	オメガラソール_AY-3_MeOH_20_40	3.55	2.08	1.178	1.145	3.652	7.597	49.974	50.026	2		2
7	11	オメガラソール_IA-3_MeOH_20_40	3.428	1.523	1.464	1.312	7.435	11.327	49.973	50.027	2		2
8	4	オメガラソール_AS-3_EtOH_20_40	2.515	1.673	1.657	1.518	1.244	2.081	49.754	50.246	2		2
9	10	オメガラソール_IA-3_EtOH_20_40	1.586	1.157	1.322	1.279	7.115	8.234	49.347	50.653	2		2

図34 ソフトウェアによる分離条件の順位付け

第4章 SFCのソリューション例

これまで見てきたように、SFCは超臨界二酸化炭素の特性により、HPLCでは困難な分離に対する一つの解決法になり得るだけでなく、前処理にも適用することが可能です。本章では、SFCならびに前処理法であるSFEの事例をご紹介します。

- 4-1 SFCによるトリグリセリドの分析
- 4-2 SFCによるキラル化合物の分離
- 4-3 オフラインSFEを用いた天然物中化合物の迅速抽出
- 4-4 オンラインSFE-SFC-QTOFMSを用いたシクレソニド吸入剤の迅速分析
- 4-5 SFCを用いた揮発性香気成分の分取精製

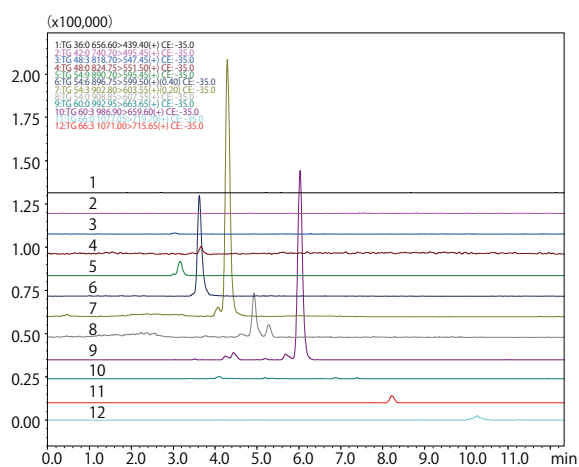
4-1 SFCによるトリグリセリドの分析

トリグリセリドは中性脂肪の一種であり、細胞がエネルギーを必要とする際に、脂肪組織などから分解されエネルギーを供給されています。トリグリセリドは極性の低い化合物で、また構造の類似性が高い化合物群であるため、通常のHPLCでは分析が困難と考えられています。ここではSFCを用いることで植物油に含まれるトリグリセリド類を分析した例を紹介いたします。なお、本分析の詳細な内容は、Application News No. C189「Nexera UC 超臨界流体クロマトグラフを用いたトリグリセリド類の分析」をご覧ください。

表7に今回の分析対象のトリグリセリドの構造を示します。ODSカラムのような疎水性相互作用による保持機構を利用する分離モードでは、アシル基の炭素鎖長が長くなると保持が大きくなり、同一の炭素鎖長の場合には二重結合の数が多くなると保持は小さくなっています。図35にヘキサで10000倍希釈した魚油を分析したクロマトグラムを示します。食用油はトリグリセリドを多く含みますが、原料の種類にトリグリセリドを構成するアシルの種類が異なり、実際には非常に多くの分子種が存在します。

表7 対象成分およびMRM

Compounds	Acyl composition	MRM
Trilaurin	TG 36:0 C12:0/C12:0/C12:0	ESI(positive) 656.60>439.40
Trimyristin	TG 42:0 C14:0/C14:0/C14:0	ESI(positive) 740.70>495.45
Tripalmitolein	TG 48:3 C16:1/C16:1/C16:1	ESI(positive) 824.75>551.50
Tripalmitin	TG 48:0 C16:0/C16:0/C16:0	ESI(positive) 818.70>547.45
Trilinolenin	TG 54:9 C18:3/C18:3/C18:3	ESI(positive) 908.85>607.55
Trilinolein	TG 54:6 C18:2/C18:2/C18:2	ESI(positive) 902.80>603.55
Triolein	TG 54:3 C18:1/C18:1/C18:1	ESI(positive) 896.75>599.50
Tristearin	TG 54:0 C18:0/C18:0/C18:0	ESI(positive) 890.70>595.45
Triicosenoin	TG 60:3 C20:1/C20:1/C20:1	ESI(positive) 986.90>659.60
Triarachidin	TG 60:0 C20:0/C20:0/C20:0	ESI(positive) 992.95>663.65
Trierucin	TG 66:3 C22:1/C22:1/C22:1	ESI(positive) 1071.00>715.65
Tribehenin	TG 66:0 C22:0/C22:0/C22:0	ESI(positive) 1077.05>719.70



- 1. TG 36:0 (Trilaurin)
- 2. TG 42:0 (Trimyristin)
- 3. TG 48:3 (Tripalmitolein)
- 4. TG 48:0 (Tripalmitin)
- 5. TG 54:9 (Trilinolenin)
- 6. TG 54:6 (Trilinolein)
- 7. TG 54:3 (Triolein)
- 8. TG 54:0 (Tristearin)
- 9. TG 60:3 (Triicosenoin)
- 10. TG 60:0 (Triarachidin)
- 11. TG 66:3 (Trierucin)
- 12. TG 66:0 (Tribehenin)

図35 魚油のクロマトグラム

Application News

Nexera UC 超臨界流体クロマトグラフを用いたトリグリセリド類の分析



Application >

4-2 SFCによるキラル化合物の分離

光学活性物質(キラル)は分子内に不斉炭素を有し、互いに鏡像の関係にあり重ね合わせるできない化合物です。これらの異性体は化学的性質や物性は同様ですが、特に生体に対する活性の違いが確認される場合が多く、製薬の創薬合成の場でのニーズが高まっています。

クロマトグラフィーによるキラル化合物の分離ではHPLC が主流でしたが、順相クロマトグラフィーによる分離条件では有機溶媒を使用するため、コストや環境負荷に対する懸念があります。SFCに用いる超臨界二酸化炭素は非極性で順相クロマトグラフィーの移動相に使用する*n*-ヘキサンに近い物性です。このため、従来の順相クロマトグラフィーによるキラル分離をSFCへ転換することが可能です。しかし、SFCによるキラル化合物の分離条件最適化においては、さまざまなカラムやモディファイアーを選択する必要があり、Nexera UCキラルスクリーニングシステムを用いて、オメプラゾールのキラル分離の条件検討をした例をご紹介します。なお、本分析の詳しい内容は、Application News No. L495「Nexera UCキラルスクリーニングシステムを用いたキラル化合物の分離条件の自動最適化」をご覧ください。

Nexera UCキラルスクリーニングシステムは、最大12本のカラムと、4種類のモディファイアーおよびそれらの混合比率を切り換えながら、多数の分離条件を自動で検討することが可能です。各々のパラメータは図32のMethod Scouting Solutionを使って設定します。表8に使用したカラムの一覧を示します。

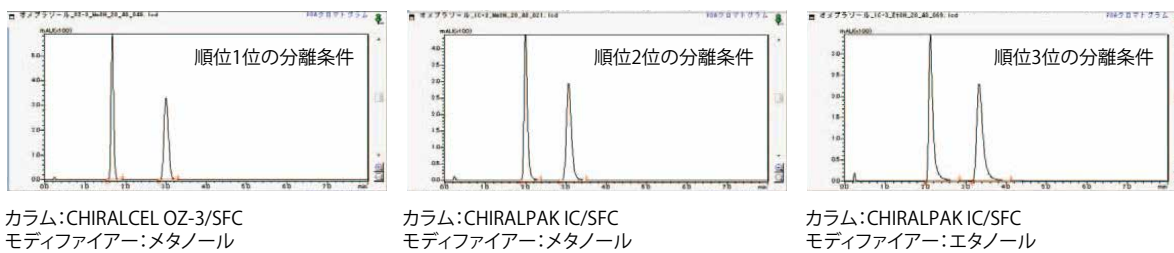
表8 分離条件の最適化に使用したキラルカラム

カラム名	固定相
CHIRALPAK® IA-3/SFC (IA)	Amylose tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate)
CHIRALPAK IB-3/SFC (IB)	Cellulose tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate)
CHIRALPAK IC-3/SFC (IC)	Cellulose tris (3, 5-dichlorophenylcarbamate)
CHIRALPAK ID-3/SFC (ID)	Amylose tris (3-chlorophenylcarbamate)
CHIRALPAK IE-3/SFC (IE)	Amylose tris (3, 5-dichlorophenylcarbamate)
CHIRALPAK IF-3/SFC (IF)	Amylose tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate)
CHIRALPAK AD-3/SFC (AD)	Amylose tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate)
CHIRALPAK AS-3/SFC (AS)	Amylose tris [(S)- α -methylbenzylcarbamate]
CHIRALPAK AY-3/SFC (AY)	Amylose tris (5-chloro-2-methylphenylcarbamate)
CHIRALCEL® OD-3/SFC (OD)	Cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)
CHIRALCEL OJ-3/SFC (OJ)	Cellulose tris (4-methylbenzoate)
CHIRALCEL OZ-3/SFC (OZ)	Cellulose tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate)

図36に、12本のキラルカラムとメタノール、エタノールおよびアセトニトリル/エタノール混液の3種のモディファイアーの組み合わせ合計36通りの分離パターンの結果を示します。オプションソフトウェアを用いて順位付けし、上位3位のクロマトグラムを図37に示します。このように分離条件の検討が煩雑なSFCによるキラル分析の最適化の労力を軽減しつつ最適化することに成功しました。



図36 キラルスクリーニングの分離結果
 モディファイアー:(a) メタノール、(b) エタノール、(c) アセトニトリル/エタノール=75/25(v/v)



カラム: CHIRALCEL OZ-3/SFC
 モディファイアー: メタノール

カラム: CHIRALPAK IC/SFC
 モディファイアー: メタノール

カラム: CHIRALPAK IC/SFC
 モディファイアー: エタノール

図37 上位3位の分離条件によるクロマトグラム

Application News

Nexera UC キラルスクリーニングシステムを用いたキラル化合物の分離条件の自動最適化

光学活性物質(キラル)は分子内に不斉炭素を有し、互いに鏡像の関係にあり重ね合わせることができない化合物です。クロマトグラフィーによるこれらキラル化合物分離ではHPLCが主流でしたが、近年は超臨界流体クロマトグラフィー(Supercritical Fluid Chromatography: SFC)の適用が注目されています。

ここでは、12本のキラル分析用カラムとメタノール、エタノールおよびアセトニトリルとエタノールの混合溶液の3種類モディファイアーを用いて、メソッドスカウティング機能を持つ Nexera UC キラルスクリーニングシステムにより、キラル化合物であるオメブラゾールのキラル分離分析の条件検討をした例をご紹介します。



Application >

4-3 オフラインSFEを用いた天然物中化合物の迅速抽出

天然物には、原薬やエッセンシャルオイル、サプリメントとして用いられる機能性のある成分が含まれています。従来、このような成分の抽出には溶媒を用いた抽出法が用いられていますが、抽出の精度は作業者間の習熟度に依存します。ここでは、Nexera UC オフラインSFEシステムにより天然物中の化合物を超臨界流体抽出した分画物をHPLCで分析した事例をご紹介します。なお、本分析の詳しい内容はApplication News「Rapid Extraction of Various Compounds from Natural Products」をご覧ください。

試料には茶葉、ショウガ、ナツメグを使用しました。これらをホモジナイズ後、脱水剤と混合したものを抽出用の容器に詰め、抽出装置にセットしました(図38)。使用した装置は「2-5 オフラインSFE-SFCシステム」の図23を参考にしてください。抽出装置の後に設置されたPDA検出器を用いて、抽出の状況をモニターしました。図39にこのクロマトグラムを示します。図中の赤色で塗られた箇所を分画し、HPLCで分析した結果を図40に示します。それぞれの天然物からSFEによって得られた画分に含まれる様々な化合物を検出することができました。



図38 前処理のフロー

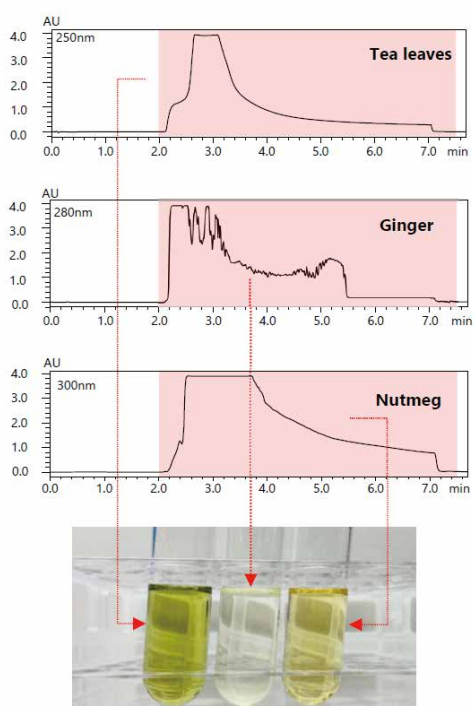


図39 天然物からの抽出の様子

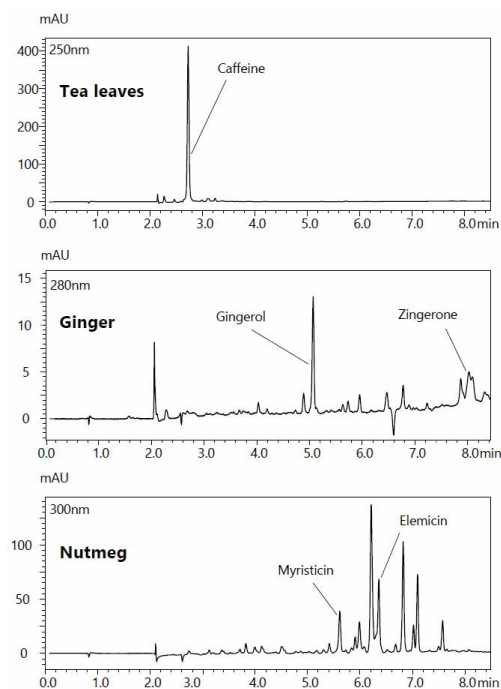


図40 天然物から抽出した画分のHPLCクロマトグラム

Application News

Rapid Extraction of Various Compounds from Natural Products



Application >

4-4 オンラインSFE-SFC-QTOFMSを用いたシクレソニド吸入剤の迅速分析

医薬品の品質維持には有効成分および不純物を確認することが不可欠であり、簡便かつ迅速なスクリーニング手法の確立は医薬品の開発期間短縮および実用化推進につながります。

ここでは、気管支喘息治療薬として用いられるシクレソニド吸入剤オルベスコに含まれる医薬品有効成分と不純物のスクリーニング分析を行った例をご紹介します。なお、本分析法の詳細はApplication News「オンラインSFE-SFC-QTOFMSを用いたシクレソニド吸入剤の迅速分析」をご覧ください。

本分析では、シクレソニド、ヨーロッパ薬局方 (European Pharmacopoeia: EP) に記載されている関連不純物A、B、C、オルベスコの医薬品インタビューフォーム (Pharmaceutical interview forms: IF) に記載されている関連不純物IF1、および容器に含まれる可能性のある不純物 (Benzothiazole: BT、2-Mercaptobenzothiazole: MBT) を対象成分としました。

オルベスコをガラスディスク上に1回噴霧した試料を抽出容器に封入し、オンラインSFE-SFC-QTOFMSにて測定しました。オルベスコ関連化合物の抽出イオンクロマトグラムを図41に、検出されたピークの精密質量を表9に示します。シクレソニド、Impurity A、Impurity B、Impurity C、BT、およびMBTは、それぞれの混合標準試料の保持時間と精密質量から同定しました。混合標準試料に含まれないImpurity IF2、Impurity IF3 (ジアステレオマーと推定される2ピーク) およびCH-CICについては精密質量から同定しました。Impurity IF1とImpurity IF4は検出されませんでした。

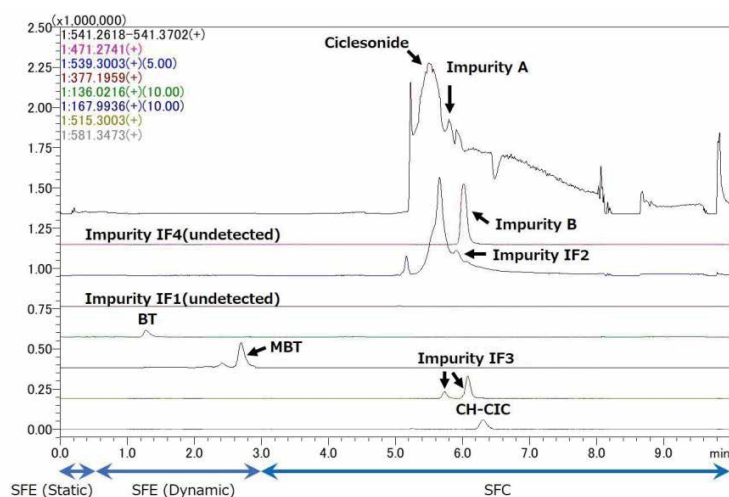


図41 オルベスコの抽出イオンクロマトグラム

表9 オンラインSFE-SFC-QTOFMSを用いてオルベスコから検出された化合物

Compound	Formula and Theoretical m/z ($[M+H]^+$)	Observed m/z	Error (mDa)	RT (min)	Listed in	
					EP	IF
Ciclesonide	$C_{32}H_{44}O_7$, m/z 541.3160	541.3159	-0.1	5.48	✓	✓
Impurity A	$C_{32}H_{44}O_7$, m/z 541.3160	541.3158	-0.2	5.87	✓	✓
Impurity B	$C_{28}H_{38}O_6$, m/z 471.2741	471.2735	-0.6	6.06	✓	✓
Impurity C	$C_{32}H_{42}O_7$, m/z 539.3003	539.2993	-1.0	5.54	✓	
Impurity IF2	$C_{32}H_{42}O_7$, m/z 539.3003	539.2995	-0.8	5.96		✓
Impurity IF3 (2 diastereomers)	$C_{30}H_{42}O_7$, m/z 515.3003	515.2998	-0.5	5.74		✓
		515.3000	-0.3	6.08		✓
CH-CIC	$C_{35}H_{48}O_7$, m/z 581.3473	581.3463	-1.0	6.33		
BT	C_7H_5NS , m/z 136.0216	136.0211	-0.5	1.27		
MBT	$C_7H_5NS_2$, m/z 167.9936	167.9932	-0.4	2.70		

Application News

オンラインSFE-SFC-QTOFMSを用いたシクレソニド吸入剤の迅速分析



Application >

4-5 SFCを用いた揮発性香気成分の分取精製

従来、香気成分のような揮発性化合物は、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いた分取が行われています。GCによる分取は高い分解能を示しますが、1回の分析あたりの試料負荷量が小さいこと、分析時間が長くなることが課題となっています。超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) を用いた分取では、液体クロマトグラフィー (LC) と同等量の試料負荷が可能であり、短時間での分析が可能です。また、SFCの溶離液に用いる液化炭酸ガスは常温常圧下で気化し、分取後の画分には少量の有機溶媒のみが含まれます。そのため、目的成分を容易に濃縮することが可能です。ここでは、ラベンダー精油中に含まれる香気成分であるリナロールを目的成分として、超臨界流体クロマトグラフ“Nexera UC” 分析フラクションシステム (2-3-3 分析フラクションシステムを参照) を用いた分取精製の例を紹介いたします。なお、本分析の詳細はApplication News「超臨界流体クロマトグラフを用いた揮発性香気成分の分取精製」をご覧ください。

分析フラクションシステムを用い、市販品リナロールの分取精製を実施しました (図42)。精製対象として約20 g/Lの試料溶液を使用しました。得られた(+)-Linaloolおよび(-)-Linaloolの画分から各成分の回収率を評価しました。いずれの目的成分も97%以上の高い収率で回収することができました (表10)。

分析フラクションシステムを用い、ラベンダー精油中に含まれるリナロールの分取精製を実施しました (図43)。市販のラベンダー精油は、メタノールで10倍に希釈した後、0.2 μmメンブレンフィルターでろ過したものを使用しました。得られた(+)-Linaloolおよび(-)-Linaloolの画分を分析フラクションシステムにより再分析し、純度確認を行いました。得られた再分析クロマトグラムを図44に、純度確認の結果を表11に示します。分析フラクションシステムによる分取において、99%を超える高純度な分取精製ができました。

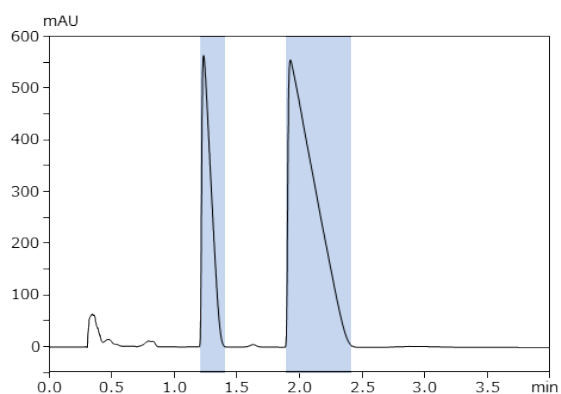


図42 市販品リナロールの分取クロマトグラム

表10 画分に含まれる目的成分の回収率

	Recovery rate (%)
(+)-Linalool	97.6
(-)-Linalool	99.3

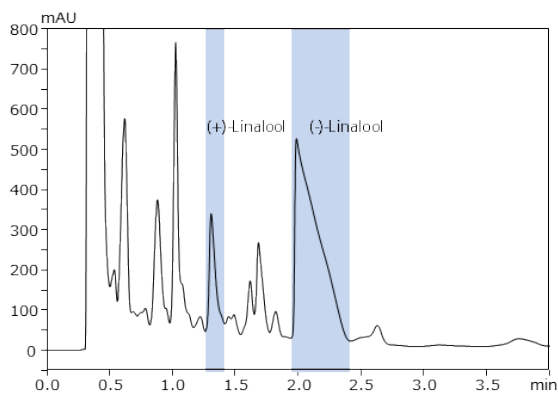


図43 ラベンダー精油の分取クロマトグラム

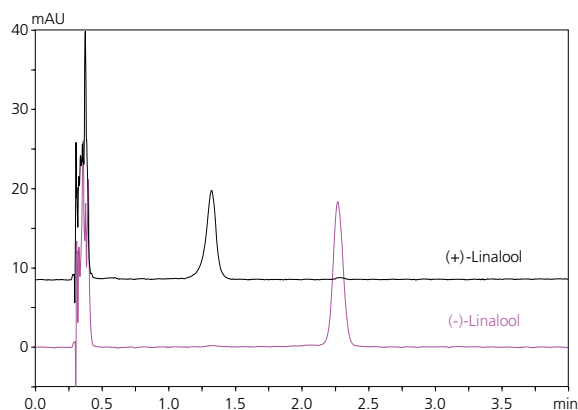


図44 回収液の再分析クロマトグラム

表11 画分に含まれる目的成分の純度
(面積百分率、ピーク検出範囲0.5 -4.0 min)

	Area (%)
(+)-Linalool	100%
(-)-Linalool	99.4%

Application News

超臨界流体クロマトグラフを用いた揮発性香気成分の分取精製



Application >

第5章 SFCに関するよくある質問

5-1 SFCの設置

Q1:室内で使用する上での注意点はありますか？

実験室内のCO₂濃度が高くないよう、ドラフトへ廃棄するなどの注意が必要です。
また、室内でのCO₂漏洩を検知する目的でCO₂メーターの設置を推奨しています。

Q2:炭酸ガスの供給温度を維持するためには、室温(湿度含め)がコントロールされた環境が望ましいですか？

カラムオープンで温度コントロールするため装置としてはメーカー推奨の条件内であればそれほど気にしなくても良いと思いますが、ポンベは設置場所の温度に影響を受けますので、気をつけられた方が良いでしょう。

Q3:今使用しているLC (Prominence™;LC-20Aシリーズ)と併用は可能ですか？

現在使用されているProminenceのユニットにモディファイアーポンプを組み合わせて使用いただくことは可能です。詳細は弊社までご相談ください。

Q4:SFCの設置に法的な届出は必要ですか？安全面や法規制などで注意点はありますか？

装置そのものに関する届出は不要です。

2016年11月1日施行の高圧ガス保安法施行令の改正により、内容積100mL以下の分析機器は高圧ガス保安法の適用除外となり、この基準を満たす当社の超臨界流体抽出・クロマトグラフシステムをご購入・設置等頂くお客様は、行政への装置の設置・変更の許可申請・届出が不要となりました。これを受けて、超臨界流体抽出・クロマトグラフシステムの安全性確保のため、高圧ガス保安協会 (KHK) と一般社団法人日本分析機器工業会 (JAIMA) は、共同で自主基準「KHK/JAIMA S 0901」を制定しています。当社の超臨界流体抽出・クロマトグラフシステムは、法の適用除外の要件を満足し、「KHK/JAIMA S 0901」に適合する認定を受けております。詳しくは下記をご参照ください。

*ただし、高圧ガスの貯蔵量に応じて、自治体に「高圧ガス貯蔵所」としての届出を行う必要があります。

<参考情報> https://www.khk.or.jp/inspection_certification/machine_facility/sfesfc_apprv.html

Q5:一般的に流通しているCO₂ポンベは使用できますか？

実験室内のCO₂濃度が高くないよう、ドラフトへ廃棄するなどの注意が必要です。そのため、室内でのCO₂漏洩を検知する目的でCO₂メーターの設置を推奨しています。また、CO₂ポンベ由来の重金属が混入すると吸着や錯体形成により分離に影響する場合があります。当社のSFC装置ではこれらを除去するためのトラップカラムを標準装備しています。

Q6:1分析あたりCO₂の使用量はどれくらいでしょうか？

1分析を10分、CO₂を100%で流量3 mL/minとした場合、約30 gとなります。この数値を元に分析時間、モディファイアー比率(=CO₂比率は小さくなる)、流量を適宜変更して計算してください。

5-2 試料・対象成分

Q1: SFCで分析する試料はHPLC同様に液体に溶けないといけないのでしょうか？

基本的にはHPLC同様に液体に溶解した試料を注入する必要があります。

しかし、超臨界流体抽出装置(SFE)を接続することにより固体試料中の成分も分析可能になります。

Q2: SFCの場合、試料の移動相溶解チェックはどのようにしますか？

超臨界二酸化炭素の極性から理想的には n -ヘキサンもしくは n -ヘプタンと2-プロパノールの混液が最適ですが、メタノールなど使用するモディファイアー100%に溶解させて使用することが一般的です。

Q3: 含水試料は注入可能でしょうか？

可能です。ただし、注入量が多い場合は試料溶媒がピーク形状や保持時間に影響を与える場合があります。

Q4: 超臨界二酸化炭素による試料の分解は起こりませんか？

超臨界二酸化炭素により移動相が弱酸性になることは知られていますが、化合物の分解等が生じる可能性は低いです。

Q5: 血液や尿などの生体試料成分をSFCに直接注入して分析した例はありますか？

血液を直接注入して分析した例は今のところないと思います。ろ紙に染みこませてSFE-SFCにより分析した例、尿試料を直接注入してSFC-MSで分析した例などはあります。^{*8-11}

Q6: HPLCで分析できてSFCで分析できない試料はありますか？

SFCでアミノ酸や水溶性ビタミン、ポリフェノールなどの高極性化合物をする場合、モディファイアー濃度を上げる、酸を添加する方法で分析することができます。ただしHPLCと比較してピーク形状が良くありません。分取面においては、分画後の乾固・精製の処理が不要という特長があります。

Q7: アルコールや水で分解する化合物を分析する場合、モディファイアーにはどのような溶媒を選択するのが一般的ですか？

水分との接触により分解ないし変性する試料を分析する場合、SFCが有利なことがあります。その際は非プロトン性の溶媒を用いられることが多いです。非プロトン性溶媒として、アセトニトリルやTHFなどが候補として挙げられます。

5-3 移動相

Q1: 分析後の廃溶媒は何が残りますか？測定対象物質を溶解した溶媒、モディファイアーおよびメイクアップ溶液でしょうか？

測定対象物質を溶解した溶媒、モディファイアーおよびメイクアップ溶液です。ただし廃液瓶には炭酸ガスも含まれるため、揮発して消失する溶媒もあります。

Q2: 親水性ペプチド測定時にピークがブロードになります。これを改善する方法としてモディファイアーにはどんな添加剤を加えるのが良いでしょうか？

SFCによるペプチド分析においてピーク形状を改善する方法としてTFA用いた分析の報告があります。^{*12}

5-4 カラム

Q1: HPLC用のカラムはSFCでも使用できますか？

SFCのカラムは、基本的に当社のHPLCシステムに合うフィッティングですので、接続は可能です。ただし、耐圧など実際の使用に関しては各カラム会社にお問い合わせください。

Q2: カラムをHPLCとSFCで兼用することはできますか？

可能です。ただし、分析終了後の液置換に関して注意が必要です。SFC分析したカラムは、カラム内の圧力を下げてCO₂を気化させる、またはメタノールやエタノールに置換して取り外してください。超臨界二酸化炭素のみで取り外した場合、カラム内の液体が揮発するため充填剤が乾燥します。このカラムをHPLCで用いた場合、メタノールや水などLCの移動相で使用する溶媒は粘性が高いため、固定相の細孔周辺で働く表面張力により細孔内に浸透できず、官能基に作用できません。SFC分析に使用する超臨界流体は、HPLCの移動相に使用する溶媒に比べて粘性が低いため、溶媒で満たされていない場合でも表面張力の影響を受けずに細孔内に浸透して、官能基と作用することができます。

また、HPLC分析に用いたカラムをSFCに用いる場合、水と超臨界二酸化炭素は混和しないため、カラム内の水をメタノールやエタノールなどで十分置換する必要があります。

Q3: SFC分析で使用するカラムの寿命は、HPLCと比較して差がありますか？

超臨界流体の粘性が低いため、充填剤にかかるかつまりカラム背圧が小さくなるため、HPLCよりカラム寿命は長くなる傾向がみられます。

Q4: SFCの分離に際して溶出順が読めないため、どのカラムをどのように使用すべきかが分かりません。SFCにおけるカラムスクリーニング、分離条件はどのように検討したらよいでしょうか。

SFCでは順相カラムから逆相カラムまで、全て同じ移動相条件で使用できます。まずは移動相の条件を固定し、複数のカラムで分離を確認する方法を推奨します。カラムの選択に関しては、3-1-2カラムの選択を参考にしてください。また、複数本のカラムと送液条件、温度、圧力など、分離に関わるパラメータの組合せの数は膨大です。分離条件検討の作業の負担を軽減するために、これらの組合せ条件を自動で設定し実行するメソッドスカウティングシステムの活用もおすすめします。

5-5 その他

Q1: HPLCと比較して、保持時間やピーク強度の再現性は同程度の精度や確度を得られるのでしょうか？

HPLCとSFCと同じ条件で再現性を比較評価した場合には同等の再現性や定量精度が得られます。

Q2: LC/MS の分析において、マトリクスやゴーストピークに悩まされていますが、SFCでも同様な現象は起こり得ますか？

SFC/MSでもマトリクスによるイオン化抑制は起こり得ます。ただし、LCとSFCでは分離挙動が大きく変わる場合がありますので、LC/MSで問題になるマトリクス効果がSFC/MSでは解消されることがあります。

Q3: SFEについて：不揮発性塩類を含む試料でも適用は可能でしょうか？

不揮発性塩類が抽出溶媒に溶解しなければ使用できます。質量分析計で検出する場合には汚れや析出にご注意ください。

参考文献

※1

Simultaneous analysis for water- and fat-soluble vitamins by a novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography

J Chromatogr.A 2014 Oct3; 1362:270-7

※2

Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases

J Sep Sci. 2008 May; 31(8):1238-51

※3

The dependence of reduced plate height on reduced velocity in carbon dioxide supercritical fluid chromatography with packed columns

Chromatographia 1987 Jan; 21-25

※4

Technical Report 超臨界流体クロマトグラフィー (C190-0442)

※5

Comparison of Retention Behavior between Supercritical Fluid Chromatography and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Various Stationary Phases

Molecules 2019 Jul; 24(13): 2425

※6

Comparison of Reversed-Phase HPLC Separation Using Carbon Dioxide and Fluoroform for Enhanced-Fluidity Liquid Mobile Phases Anal.Chem.1998,70,1595-1603

※7

Packed column supercritical fluid chromatography of hydrophilic analytes via water-rich modifiers

Journal of Chromatography A, Volume 1250, 10 Aug 2012, P196-204

※8

Carotenoids and apocarotenoids determination in intact human blood samples by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry

Analytica Chimica Acta , Volume 1032, 22 Nov 2018, P40-47

※9

High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis Journal of Chromatography A, Volume 1250, 16 Jun 2012, P69-75

※10

High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis Journal of Chromatography B, Volume 1076, 10 Aug 2012, P196-204

※11

Use of on-line supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry to analyze disease biomarkers in dried serum spots compared with serum analysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Rapid Communications in Mass Spectrometry, Volume 31, 30 May 2017, P886-894

※12

Advantageous use of SFC for separation of crude therapeutic peptides and peptide libraries

J Pharm Biomed Anal. ,Volume 185, 5 Jun 2020

Nexera、LotusStream、Shim-pack、LCMSおよびProminenceは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。
CHIRALPAKおよびCHRALCELは、株式会社ダイセルの登録商標です。

本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。
本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。
治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。
外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

製品情報



価格お問合せ



東京支社 (官公庁担当) (03) 3219-5631 (大学担当) (03) 3219-5616 (会社担当) (03) 3219-5622	つくば支店 (官公庁・大学担当) (029) 851-8511 (会社担当) (029) 851-8515	名古屋支店 (官公庁・大学担当) (052) 565-7521 (会社担当) (052) 565-7531	広島支店 (082) 236-9652
関西支社 (06) 4797-7230	北関東支店 (官公庁・大学担当) (048) 646-0095 (会社担当) (048) 646-0081	京都支店 (官公庁・大学担当) (075) 823-1604 (会社担当) (075) 823-1603	九州支店 (官公庁・大学担当) (092) 283-3332 (会社担当) (092) 283-3334
札幌支店 (011) 700-6605	横浜支店 (官公庁・大学担当) (045) 311-4106 (会社担当) (045) 311-4615	神戸支店 (078) 331-9665	島津コールセンター ☎ 0120-131691 (操作・分析に関する相談窓口) IP電話等:(075) 813-1691
東北支店 (022) 221-6231	静岡支店 (054) 285-0124	岡山営業所 (086) 221-2511	
郡山営業所 (024) 939-3790		四国支店 (087) 823-6623	