

超臨界流体クロマトグラフィーって

何ができるの？ ～基礎からわかりやすく教えます！～

(2020/7/27 Webinar開催)

60分で語る！ SFCの面白さと奥深さ

(2021/4/16 Webinar開催)

Q&A集

目次

1, SFCの分離/原理/特性

2, サンプルの適応性

3, 分析システム

4, カラム関連

5, 定量精度/再現性

6, 検出器関連

7, MS関連

8, SFE抽出

9, 法規制

10, SFC-MS

11, その他

※2020年7月開催時のQ&Aを**黒字**で、2021年4月開催時のQ&Aを**青字**で記載しております。

※本Q&A集に掲載されている内容は、講師の馬場健史先生および島津製作所に回答をいただいたものとなります。

※本Q&A集の無断転載・無断使用を固く禁じます。

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q1：超臨界CO₂によるサンプルの分解（酸）は見られませんか。

A1：超臨界CO₂により移動相が弱酸性になることは知られていますが、化合物の分解等に対する影響はないと思います。（馬場先生）

<参考文献>

「Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase」
Journal of Chromatography A, 1492 (2017) 136-143

Q2：超臨界CO₂を送液ポンプで冷やしているとのことでしたが、その後どの部分で加熱し超臨界流体としているのでしょうか。

A2：カラムオーブン内でカラムを加熱することにより超臨界状態を保ちます。（島津製作所）

Q3：超臨界CO₂以外を使用したSFCの分析例があるとのことですが、他にどのような移動相とモディファイアを使用したものがありますか。

A3：SFCの移動相として超臨界状態のフルオロフラン（CHF₃）にメタノールや水を加えた系の報告があります。（馬場先生・島津製作所）

<参考文献>

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

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q4：LCでいう廃液はどのような形で出てくるのでしょうか。

A4：超臨界CO₂は背圧制御弁（BPR）の後にガスの状態で排出されます。一緒に加えるモディファイア（メタノールなど）はLC同様に廃液瓶で回収します。なお、セミマイクロの系でモディファイアが少ない場合には、ほとんど廃液は残りません。（馬場先生・島津製作所）

Q5：SFCで分析するサンプルはHPLC同様に液体に溶けないといけないのでしょうか。

A5：基本的にはHPLC同様に液体に溶解したサンプル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サンプル中の成分も分析可能になります。（馬場先生）

Q6：SFCを使用する上で注意する必要がある点を教えてください。

A6：基本的にHPLCと同じと思っていただいても良いのですが、移動相が液体ではなく、ガスに近い性質を持っていることを認識することです。配管やカラムから漏れがないようにしっかり閉めることが重要です。送液ポンプのヘッド部分がしっかり冷えている状態になってから使用することや、カラムに移動相がしっかりなじむまでプレランを何度かやることなどが再現性の高いデータを取得するために重要なポイントです。また、温度、圧力によって炭酸ガスの密度が変化するために、装置やボンベの設置場所、配管等にも気を配った方が良いでしょう。また、ボンベの残量が少なくなると圧力が変わるので、連続分析の際は注意が必要です。（馬場先生）

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q7：SFCを用いることで初めて分析できた事例はありますか。（GCやHPLCでは分析できなかったもの）

A7：今回の講演でお話しさせていただいたポリプレノールの精密分析、農薬の一斉分析、親水性および脂溶性ビタミンの一斉分析などになりますが、他にもポリマーや異性体の分離などの報告があります。

なお、SFCによるポリマー分析は、[Q31](#)、[Q32](#)および[Q38](#)のご質問でも具体的な分析例を示しておりますので、併せてご確認ください。（馬場先生）

<参考文献1>

「Analysis of long-chain polyprenols using supercritical fluid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry」 Journal of Chromatography A Volume 995, Issues 1-2, 2 May 2003, Pages 203-207

<参考文献2>

「High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/ tandem mass spectrometry」 Journal of Chromatography A Volume 1266, 30 November 2012, Pages 143-148>

<参考文献3>

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

Journal of Chromatography A Volume 1362, 3 October 2014, Pages 270-277>

Q8：メタボロームやプロテオームなどで多くの化合物を一斉分析する場合、ピークが重なることがあると思います。

そういう場合はLC同様に前処理が必要になるのでしょうか。あるいは機械側で対策をとれるのでしょうか。

A8：メタボローム分析、プロテオーム分析の場合は、ピークキャパシティを超える成分が溶出してきますので、クロマトグラフィーだけでは分離不可能です。実際には質量分析計との組み合わせにより共溶出している成分を何とか分離している状況です。また、多成分の一斉分析を目的とするオミクスにおいては、前処理をできるだけ行わないようにしていますが、必要に応じて前処理をした方が良いでしょう。（馬場先生）

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q9：モディファイアを加えていっても超臨界状態は維持できるのでしょうか。

A9：モディファイアの量が増えると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。（馬場先生・島津製作所）

Q10：移動相に酸を添加したりはできますか。

A10：LCと同様に可能です。（馬場先生）

Q11：揮発性化合物の抽出におけるGCに対するSFCの優位性として、検出限界との説明がありました。もう少し詳しく教えてください。

A11：SFCではHPLCと同じように分取用のカラムを用いることにより、多量のサンプルを分取することが可能です。また、MSを接続した場合のGCの場合は電子イオン化（EI）になりますので、SFCの大気圧イオン化（API）と比べて大きな感度差があります。ただし、APIでイオン化されにくいものについては、EIのほうが有利になることもあります。（馬場先生）

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q12：揮発性化合物の分取をGCとSFCで（分取の限界）を比較しておられましたが、どこがちがうのか、もう少し詳しくお教えてください。

A12：GCでも揮発性化合物を分析することが出来ますが、試料を揮発させる必要があります。

GCによる分取ではサンプルを多量に注入することが難しいことや、分離後にロスなく回収する方法が難しいなどの課題があります。一方、SFCはHPLCと同じように液体サンプルを注入し、分取用カラムによる多量のサンプルを分取することが可能です。（馬場先生・島津製作所）

Q13：親水性ペプチドを測定する際に生じるピークブロードを改善する方法としてメタノールや水に加える添加剤（酸や塩基）がありましたら教えてください。

A13：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を用いて分析している報告があります。（馬場先生・島津製作所）

<参考文献>

「Advantageous use of SFC for separation of crude therapeutic peptides and peptide libraries」 J Pharm Biomed Anal. 2020 Jun 5;185:113227.

Q14：炭酸ガスの供給温度が分析に影響するというお話しでしたが、SFC分析装置を運用する場合、室温(湿度含め)がコントロールされた環境でないと難しいのでしょうか。

A14：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、ボ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。（馬場先生）

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q15：超臨界炭酸の極性は、温度と圧力を変化させるとどのように変化するのでしょうか。

A15：超臨界流体は温度と圧力を変化されることにより、誘電率が変わります。

誘電率は溶媒の極性と関連しており、温度、圧力を変化させることにより、極性が変化させることができます。具体的には超臨界CO₂は密度が高くなると極性が高くなります。また、圧力が高くなると密度が高くなるため極性が高くなります。

一方、温度が高くなると密度が低くなるため極性は低くなります。（馬場先生・島津製作所）

Q16：超臨界流体とはひとくくりの状態ではなく、温度を上げれば上げるほど抽出力や拡散性が変わるのでしょうか。

A16：その通りです。超臨界流体は、温度、圧力が変わることにより物性が変化します。（馬場先生）

Q17：超臨界流体の粘性は温度上昇で増加するのでしょうか。それとも低下するのでしょうか。

A17：温度が上昇すると密度が低くなるため粘性は低下します。（馬場先生・島津製作所）

区分1：SFCの分離/原理/特性

Q18：超臨界CO₂を用いたSFCは疎水性物質なら何でも溶解させることが可能なのでしょうか。重金属などの混入については何か影響あるのでしょうか。

A18：超臨界CO₂は疎水性なので低分子の殆どの疎水性物質を溶解させることが可能です。重金属が混入した場合、吸着や錯体形成により分離に影響する場合があります。これらの由来はCO₂ボンベの場合が多いため、島津製作所の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で装備しています。
(馬場先生・島津製作所)

Q19：分析終了した最終的な廃溶媒として残るのは、バイアルに測定対象物質を溶解した溶媒、モディファイア及びメイクアップ溶液のみとなるのでしょうか。

A19：そのとおりです。ただし廃液瓶に炭酸ガスが吹き込むこととなりますので、溶媒はいくらか揮発して消失してしまいます。(馬場先生・島津製作所)

Q20：溶出順は超臨界CO₂の密度によって決まるということですか。

A20：溶出順番は超臨界CO₂の密度だけでは決まりません。もちろん、添加するモディファイアの溶媒の種類、量により、カラムとの相互作用や化合物の移動相に対する溶解度も変わります。(馬場先生)

区分1 : SFCの分離/原理/特性

Q21 : Nexera UC Prep導入時に推奨されていた、回収量を維持するための最低流量を大きく下回る分析流量でも、回収量が維持できるのは何故なのでしょう。

A21 : 分取SFCにおいて低流量条件下では一般的に回収量が下がる傾向があります。しかし、Nexera UC Prepに採用した気液分離セパレーター“LotusStream”（特許取得完）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することができるため、サンプルの飛散やキャリーオーバーを抑制しながら高い回収量を得ることができます。また、揮発性の高い化合物（例えば香料のリナロールなど）でも流量やモディファイア濃度に依らず、良好な回収量が得られます。（島津製作所）

Q22 : メソッド開発時のグラジエント条件において0~100%までモディファイアを変更する時、流量はどのように決定すればよいのでしょうか。モディファイアが増えると圧力が高くなりますか？

A22 : モディファイアの比率を100%まで高めて分析する場合には、LCで分析する流量に設定されることをお奨めします（例えば内径2 mmの粒子径2.2 μm のカラムであれば0.4~0.5 mL/min程度）。また、モディファイア比率の増加に伴い、カラムの背圧は高くなります。（島津製作所）

Q23 : SFCで分析対象の感度を改善したい場合、まずはメイクアップ溶媒の種類を検討するのが良いのでしょうか？それともモディファイヤーの種類を検討するのが良いのでしょうか

A23 : モディファイアの種類を変更すると分離が変わりますので、感度を改善したい場合には、メイクアップの溶媒種をご検討ください。既存の条件を軸にまずは添加剤の検討をお奨めします。添加剤はLC/MSで使用される揮発性溶媒や、水の添加により感度が向上する可能性があります。（島津製作所）

区分2：サンプルの適応性

Q24：アルコールや水で分解する化合物を分析する場合、どのような溶媒を用いるのが一般的ですか。

A24：水分を嫌うサンプルを分析する場合、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。
(馬場先生・島津製作所)

Q25：LCで分析出来て、SFCで分析が出来なかったものがありますか。

(例えばSFCでは分解する。分離がうまくいかないなど)

A25：SFCは疎水性の超臨界CO₂がベースですので、水にしか溶解しないような極性の高い成分は不得意です。分解してしまうものはないと思います。(馬場先生・島津製作所)

Q26：SFCでは脂溶性から水溶性までを幅広く扱えるのが特徴とお話されていましたが、アントシアニンなどのポリフェノール類の分析は苦手と感じます。この点、何か知見ありましたらお願いします。

A26：ポリフェノール類をSFCで分析した例がありますので、余り苦手な化合物ではないと思います。
(島津製作所)

<参考文献 1>

「Fractionation of *Mangifera indica* Linn polyphenols by reverse phase supercritical fluid chromatography (RP-SFC) at pilot plant scale」
The Journal of Supercritical Fluids Volume 95, November 2014, Pages 444-456>

<参考文献 2>

「A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables」 Food Chem. 2011 Jun 15;126(4):1821-35.>

<参考文献 3>

「Polymeric stationary phases based on poly(butylene terephthalate) and poly(4-vinylpyridine) in the analysis of polyphenols using supercritical fluid chromatography. Application to bee pollen」 J Chromatogr A. 2018 Oct 19;1572:128-136

区分2：サンプルの適応性

Q27：SFCにマッチしない化合物はありますか。またその時の対処法があれば教えてください。

A27：SFCにマッチしない化合物としては超臨界CO₂に溶解しにくいものです。その場合は、モディファイアの濃度を上げて溶解させることによりSFCで分離することが可能になります。アミノ酸など極性の高い化合物についても、TFAなどの添加することにより30%程度のモディファイアの添加でSFCによる分離ができることがわかっています。（馬場先生）

<参考文献>

「Development of a novel method for polar metabolite profiling by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry」

Journal of Chromatography A, in press

Q28：SFCを用いて水溶性成分を分離することは可能でしょうか。Q&Aセッションでは分析可能と仰っていましたが、超臨界CO₂により固化する場合があると仰っておられました。大量の水分が混じったエタノール溶液などをサンプルとした際、詰まる原因になると思いましたが如何でしょうか。

A28：水溶性ビタミン類の分析例のように高いモディファイア濃度になるためSFCと言えない移動相の状態になる場合もありますが、水溶性成分の分離も可能です。

水溶性成分はインジェクションされた際に溶解できない場合は固化しますが、超臨界CO₂の高拡散性の性質により分散しますので、かなりの濃高濃度でないかぎりカラムが詰まることはないと思います。（馬場先生）

区分2：サンプルの適応性

Q29：イオン性界面活性剤の分析はSFCには向いていないでしょうか。

A29：化合物によるところがありますが、SFCで分離できているものもあります。（馬場先生・島津製作所）

<参考文献1>

「Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of non-ionic surfactant materials using chloride-attachment negative ion chemical ionization」 Journal of Chromatography A Volume 505, Issue 1, 25 April 1990, Pages 199-213>

<参考文献2>

「Supercritical fluid extraction and chromatography of non-ionic surfactants combined with FTIR, APCI-MS and FID detection」 Analyst, 1999, 124, 1501-1505>

<参考文献3>

「Characterization and analysis of non-ionic surfactants by supercritical fluid chromatography combined with ion mobility spectrometry-mass spectrometry」 Analytical and Bioanalytical Chemistry (2019) 411:2759-2765>

区分2：サンプルの適応性

Q30：クロロフィルやヘムの単離・分取に利用できたら、と思っているのですが、モディファイアなしの超臨界CO₂のみでクロロフィル程度の極性の化合物を展開させることは可能でしょうか。あるいは、低沸点のmodifierがあれば、教えていただけますか。

A30：超臨界CO₂を用いて分析することも可能です。さらには圧力を変化させて極性変化をつけることもできます。クロロフィルの分析例は下記参考文献をご参照ください。（島津製作所）

<参考文献1>

「Development of an analytical method for chlorophyll pigments separation by reversed-phase supercritical fluid chromatography」
Journal of Chromatography A, Volume 1612, 8 February 2020, 460643>

<参考文献 2>

「Separation of Chlorophylls and Their Degradation Products using Packed Column Supercritical Fluid Chromatography (SFC)」
J. High Resol. Chromatogr. VOL. 22, JUNE 1999>

区分2：サンプルの適応性

Q31：ポリマーの分析事例で通常のHPLCではブロードな一つの山になってしまうところが、一つ一つ分かれて鋭いピークとして分析できていましたが、条件さえ工夫すればPEGやグリセリンのポリマーの長さ違いはSFCで分離できると考えてよいのでしょうか。

A31：ポリマーの種類や鎖長にもよりますが、いくつかの報告があります。（島津製作所）

<参考文献>

「Unusual effect of flow rate on retention in analytical supercritical fluid chromatography exemplified by polyethylene glycol separation」
Journal of Chromatography A 1610 (2020) 460513

Q32：ポリマーを含むサンプルのSFCでの分離事例はございますでしょうか。

A32：ポリマーの分離については多くの報告があります。ご興味がある場合はポリマー名称で文献調査されることをお勧めします。（島津製作所）

<参考文献>

「Analysis of long-chain polyprenols using supercritical fluid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry」
Journal of Chromatography A, Volume 995, Issues 1-2, 2 May 2003, Pages 203-207>

Q33：医薬品の光学異性体の分析なども行えると思いますが、難しいケースはありますか。

A33：光学異性体の分離はSFCの得意とするところですが、化合物の極性が高い場合など溶解性が悪い場合はSFCでの分離が難しい場合があります。（馬場先生）

区分2：サンプルの適応性

Q34：含水試料は注入可能でしょうか。

A34：可能です。ただし、注入量が多い場合はサンプル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ので注意が必要です。（馬場先生・島津製作所）

Q35：血液や尿などの生体試料成分をSFCにダイレクトに注入して分析した例はありますか。

A35：血液などの液体を直接注入して分析した例はないと思いますが、ろ紙に染みこませてSFE-SFCにより分析した事例や、尿サンプルを直接注入してSFC-MSで分析した例などがあります。（島津製作所）

<参考文献 1>

「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 November 2018, Pages 40-47

<参考文献 2>

「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 (2012) 69– 75>

<参考文献 3>

「Supercritical fluid extraction (SFE) of ketamine metabolites from dried urine and on-line quantification by supercritical fluid chromatography and single mass detection (on-line SFE-SFC-MS)」 Journal of Chromatography B 1076 (2018) 77-83>

<参考文献 4>

「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 Commun. Mass Spectrom. 2017, 31, 886-894

区分2：サンプルの適応性

Q36：SFCでは高極性化合物の分離がいまいちな印象がありますが、いかがでしょうか。

A36：やはり超臨界CO₂に溶解性が悪い高極性化合物は、分離が思わしくないものが多いと思います。
(馬場先生)

Q37：残留農薬検査業務を行っています。現在は、GCMSとLCMS/MSで約700種類の農薬を検査しておりますが、SFCで全て測定可能なのでしょうか。

A37：現在500種類ほどの農薬をSFCで分析できることは確認できています。LC/MSで分析可能な化合物はほとんど分析できますが、GC/MSで分析されているEIでしかイオン化しない化合物については、SFC/MSで分析することは現状は難しいと考えます。(馬場先生・島津製作所)

<参考文献 1>

「High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry」
Journal of Chromatography A, Volume 1266, 30 November 2012, Pages 143-148」

<参考文献 2>

「High-Throughput Simultaneous Analysis of Pesticides by Supercritical Fluid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry」
J. Agric. Food Chem. 2015, 63, 18, 4457-4463

<参考文献 3>

「Importance of optimizing chromatographic conditions and mass spectrometric parameters for supercritical fluid chromatography/mass spectrometry」
Journal of Chromatography A, 1508 (2017) 138-147

区分2：サンプルの適応性

Q38：親水性ポリマーは分析可能でしょうか。

A38：サンプルが溶解すれば分析は可能です。また、ポリエチレングリコールなどの分析例はあります。

(馬場先生・島津製作所)

<参考文献 1>

「Evaluation of supercritical fluid chromatography for testing of PEG adducts in pharmaceuticals」
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 88, 25 January 2014, Pages 256-261

<参考文献 2>

「Quantitative comparison of a corona-charged aerosol detector and an evaporative light-scattering detector for the analysis of a synthetic polymer by supercritical fluid chromatography」
Journal of Chromatography A, 1193 (2008) 151-155

Q39：中分子やタンパク（抗体）などの分離はできるのでしょうか。

A39：サンプルを溶解し、最適な検出方法があれば試す価値はあると考えます。

なお、親水性のペプチドを分析した事例がございますので合わせて[Q13](#)もご参照ください。

(島津製作所)

区分3：分析システム

Q40：SFC-SFEの仕組みについてですが、分析試料をSFEで大まかに分けた後、さらに細かくSFCで分析しているのでしょうか。また、オフラインとは、分析用カラムにだけ超臨界流体を流すことを指すのでしょうか。オンラインとオフラインの場合の、装置の状態の違いを教えてください。

A40：SFEは、超臨界流体に溶解する成分すべてがサンプルから抽出され、溶解しないものは抽出容器に残ったままとなります。その為、溶解する成分としない成分を分けている、と言えます。溶解した成分のみを回収する手法がオフラインSFEとなります。オンラインSFE-SFCでは、SFEにより抽出した成分をダイレクトでSFCに注入して成分を分離します。その為、オフラインSFEでは抽出装置(SFE-30A)とそれを回収するフラクションコレクタが必要となります。オンラインSFE-SFCの場合、カラムを温調するオーブンと検出器(PDA、MS)が必要となります。(島津製作所)

Q41：SFCの分析例で最終的にモディファイアが100%になっていましたが、バックプレッシャーの設定はどのようにされているのでしょうか。

A41：モディファイア100%の場合も、圧カショックを発生させないためにSFC条件で分析します。(島津製作所)

Q42：現在使用しているProminence (LC-20Aシリーズ) と併用は可能でしょうか。今使用しているLCの装置を改造してSFCを行うことは出来ますでしょうか。

A42：現在使用されているProminenceのユニットにモディファイアポンプを組み合わせ使用頂くことは可能です。詳細につきましては別途ご相談ください。(島津製作所)

区分3：分析システム

Q43：装置を立ち上げた直後は温度が上がってしまうとのことでしたが、立ち上げにはどれくらい時間を要しますか。制御装置などで温度などのパラメータを確認することはできますか。

A43：超臨界CO₂を安定して送液するためには送液ポンプのヘッド部分を5℃に冷却する必要がありますが、これはおおよそ10分程度で冷却されます。

このパラメータは装置本体またはソフトウェア(LabSolutions)から設定/確認することが出来ます。
(島津製作所)

Q44：バックプレッシャーレギュレーター (BPR) の留意点について教えてください

A44：分析条件にもよりますが、背圧を制御するブロック部が摩耗するため、定期的 (1~2年) に交換する必要があります。なお、ブロックの交換自体はお客様ご自身で行うことが可能です。(島津製作所)

区分4：カラム関連

Q45：HPLC用カラムを使用できるとのことですが、カラムをHPLCとSFC兼用で用いることもできますか。どのような注意点がありますか。

A45：可能です。ただし、SFCで使用した後はカラム内の超臨界CO₂が気化します。LCの観点では「枯れたカラム」を使用することになる点にご留意ください。また、水と超臨界CO₂は混和しないため、LCカラムをSFCで使用する場合は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。（島津製作所）

Q46：HPLC用のカラムが使用可能とされていましたが、使用後はどのように取り外しをするのでしょうか。カラムが液で満たされていることが重要と考えていますが、カラムの劣化につながらないでしょうか。

A46：使用後、カラム内の圧力を下げて、CO₂を気化させた後に取り外します。充填剤の官能基は細孔の中にありますが、カラムを枯らしてしまうと、この穴の手前で表面張力が働くため、LCではカラムを移動相で満たされていることが重要です。この表面張力は液体の粘性によるものですが、SFCで使用する超臨界流体はこの粘性が低いため、表面張力が働かず、移動相が官能基にアクセスすることが出来ますので、問題ありません。（島津製作所）

Q47：HPLC用のカラムを使用できるとのことですが、「SFC対応HPLCカラム」や「SFC専用カラム」との違いを教えてください。また、そのようなカラムを用いる利点は何でしょうか。

A47：かつて高圧ガス保安法の適用を受けていた当時に法規制への対応、適用除外となった現在は高圧ガス保安協会の認定を受けたカラムを「SFC対応HPLCカラム」と呼ぶことがあります。「SFC専用カラム」は化学的あるいは物理的な何らかの理由で専用としていると考えます。詳しくは各カラム会社にお問い合わせください。（島津製作所）

区分4：カラム関連

Q48：Intertsil ODS-EPカラムは順相&逆相の二本を繋げなくても似た挙動の留出が可能ということでしょうか。

A48：順相&逆相の二本を繋げた場合とは分離挙動は異なります。Intertsil ODS-EPカラムでは、ODSとの疎水性相互作用がメインですが、分離する化合物によっては根もとの極性基との相互作用が出ることがあります。
(馬場先生)

Q49：LC用のカラムはほぼすべて利用できると考えてよいでしょうか。

A49：弊社のLCシステムと基本的に同じ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。(島津製作所)

Q50：SFCの固定相として使用する充填剤はどのような物性を持つものが、特に有用でしょうか。

カラムの種類に制限はありますか。LCのカラムであれば何でも使用できるのでしょうか。
充填剤の材料(シリカ、樹脂)や形状(全多孔性、コアシェル、モノリスなど…)、カラム管の材質など、気を付ける点があれば教えてください。

A50：カラムの制限はございません。例えばキラルを分離した場合はキラルカラムを使用するなどその目的によって変わります。ただし、ポリマー系カラムは固定相が膨張することがありますので注意が必要です。
(島津製作所)

区分4：カラム関連

Q51：カラムのスクリーニングをどのように行うべきか。（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らない）。また、今後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。

A51：順相LCで用いられるカラムから逆相LCで用いられるカラムまで全て同じ移動相条件で使うことが出来るので、最初は条件を統一して行うのが良いと考えます。分析対象によってカラム選択方法が変わってきますので詳細はご相談ください。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。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「カラムスクリーニングシステム」の活用もお勧めです。（島津製作所）

Q52：カラムの寿命はLCと変わらないと考えていいでしょうか。

A52：超臨界流体の粘性が低いため、充填剤にかかる力＝カラム背圧が小さくなるため、LCよりカラム寿命は長くなります。また、SFCではカラム内を一旦枯らしたとしてもメタノールやエタノールなどで置換することにより使用することが出来ますので、LCで使用する場合と比較してカラム寿命は長いと言われています。（島津製作所）

Q53：カラムをつなげると分離が向上するとのことでしたが、長いカラムを使うのと短いカラムを繋げるのでは分離状態に違いはありますか。

A53：カラム接続配管の有無や本数が分離に影響を与えることがありますのでご注意ください。例えば、50cmカラムによる高分離条件を構築する場合、5本の10cmカラムと4本の接続配管、もしくは2本の25cmカラムと1本の接続配管が必要となりますが、接続配管の本数が少ない25cmカラムの方が分離が良い場合があります。（島津製作所）

区分4：カラム関連

Q54：カラムを長くすると分離能が上がりますが、実質、どの位の長さまでカラムを繋げることができますか。

A54：充填剤の粒子径、流量、移動相のうち超臨界CO₂を何パーセントにするのか、何をモディファイアに使用するのかなど、多くの条件が影響致しますので、一概に申し上げることは出来ません。

UHPLCで利用される粒子径サブ2 μm、内径3 mmのカラムを50 cmの長さに繋いだ分析事例はあります。

(島津製作所)

Q55：逆相、順相カラムをつなぎ合わせると、最初のカラムで分離できた化合物が次のカラムの中で溶出順番が変わり、ピークが重なることが起きるのではないかと考えたのですが、そのようなことはないのでしょうか。

A55：連結するカラムが2本と仮定した場合、前のカラムと後ろのカラムでは圧力が異なるため極性も異なります。そのため、連結するカラムの充填剤が異なる場合は接続する順番により異なる選択性や溶出順になる可能性があります。(島津製作所)

Q56：固定相をスルホン酸基やジオール基にすると高極性化合物も分析できるとのことでしたが、その時の移動相にCO₂を使うことは可能なのでしょうか。

A56：移動相に超臨界CO₂を使うことは可能です。

ただし極性のモディファイアを添加する必要があります。(島津製作所)

区分4：カラム関連

Q57：順相カラムと逆相カラムを接続できるとのことですが、複数のカラムの順番を変えると分離が変わることはありますか。

A57：カラムをシリアルに2本連結した場合、後段のカラムはバックプレッシャーレギュレーター（BPR）の設定圧力と同程度の圧力がかかりますが、前段のカラムには設定圧力に加えて後段のカラム背圧が加わります。カラムの前段・後段において超臨界CO₂の密度が異なる（極性が変化する）ことから、分離パターンが変わることがあります。（島津製作所）

区分5：定量精度/再現性

Q58：各種再現性（保持時間やピーク強度など）は十分に取れるのでしょうか。

また、定量性についてはどこまでの精度や確度が得られますか。

A58：LCとSFCと同じ条件で再現性を比較評価した場合、同等の再現性や定量精度が得られるとお考えいただいて問題ありません。（島津製作所）

区分6：検出器関連

Q59：SFCで使用できない検出器はありますか。

A59：現時点では示差屈折率、蛍光検出器は使用できません。これはSFCではカラム出口に背圧をかける必要があるため、検出器セルの高耐圧化が必要になります。（島津製作所）

Q60：SFCに適した検出器は、MS、PDAの他、何になりますか。

A60：ELSDも使用可能です。（島津製作所）

Q61：今あるTOF-MSと新たに購入したSFCをつなぐことは可能でしょうか。

A61：可能ですが、島津製作所製以外のMSを使用する場合、制御ソフトウェアがSFC用(LabSolutions)とMS用の2つが必要となります。（島津製作所）

区分7：MS関連

Q62：LC-MSの場合、カラムの劣化（つまり、peak形状の悪化、保持時間の変化）やMSの汚れによる感度低下が起こりますが、SFC-MSでも同様でしょうか。LC-MSと違いがあれば教えてください。

A62：SFC-MSも基本的にはLC-MSと同じと考えていただいて良いと思います。（島津製作所）

Q63：SFC/MSの大気圧イオン化はどのようになりますでしょうか。従来のクロマトと変わるところはありますか。。

A63：超臨界CO₂はイオン化促進効果がないため、MS用のメイクアップが必要となります。それ以外はLC/MSと同様であり、ESIもAPCIも使用可能です。（島津製作所）

区分8：SFE抽出

Q64：SFEについて：不揮発性塩類を含むサンプルでも適用可能か（MSで検出を考えて）、プレカラム等で塩類の除去なども可能でしょうか。

A64：不揮発性塩類が抽出溶媒に溶解しなければ使用可能です。

ただし、質量分析計での検出を考えた場合には汚れや析出などにご注意ください。（島津製作所）

Q65：コーヒー豆からカフェインを抽出とありますが、超臨界流体の密度をコントロールしてカフェインだけを抽出するということでしょうか。もしそうであれば、例えば樹脂中のある成分のみを超臨界流体で抽出するようなことはできるのでしょうか。

A65：温度・圧力を変化させることにより溶解性を変化させることができるので、目的成分を抽出しながらも他の成分は抽出しない条件を探す必要はありますが、抽出できる可能性はあります。

また、温度・圧力を変え、溶解性を変化させることができるため、選択的に抽出することも可能です。

（島津製作所）

区分9：法規制

Q66：高圧ガス保安法を考えると、御社の分取装置を使用する際、カラムサイズがどのくらいになると申請が必要になるのでしょうか。

A66：システム全体で100 ccを超えると申請が必要となります。また、弊社が販売しているカラムの最大内径は28 mm i.d.であり、このサイズ以内であれば特別な申請は不要です。（島津製作所）

Q67：CO₂ガスボンベが必要になるとのことでしたが、設置に関して法令や施設面で必要な対応はありますか。

A67：ガスボンベを既に使用・設置されているのであれば特別な対応や申請は不要です。

また、既定の貯蔵量を超えない範囲でCO₂ボンベを設置いただくことが可能です。

なお、弊社SFCシステムは高圧ガス保安法の適用除外の認定を受けているため、法令の届け出は不要です。（島津製作所）

Q68：

- ・ 高圧ガス製造所の届出は必要になりますか。
- ・ 設置に関しては法的（高圧ガス法）対応が必要になるのでしょうか。
- ・ 安全面や法規制などで注意すべき点あればご教示ください。

A68：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100 mL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、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。

* 但し、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。
(島津製作所)

<参考情報>

https://www.khk.or.jp/inspection_certification/machine_facility/sfesfc_apprv.html

Q69 : 現在マトリックスやゴーストピークに悩まされておりますが、そのような現象はSFCにはありますでしょうか。

A69 : SFC/MSでもマトリックスによるイオン化抑制は起こり得ます。

LCとSFCでは分離挙動が大きく変わることがあり、LC/MSで問題となるマトリックス効果がSFC/MSで解消されることもあります。（島津製作所）

区分11：その他

Q70：室内で使用する上での注意点はありますか。

A70：実験室内のCO₂濃度が高くならないよう、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。（島津製作所）

Q71：質疑応答でお話があったCO₂ポンベの金属片混入防止策として、ポンベ業者に相談すれば新品ポンベ購入が可能とのことでした。一般に出回っているポンベは仕様に耐えられないレベルなのではないでしょうか。もう少し詳しくご説明頂けると助かります。

A71：一般に販売されている99.9%のCO₂ポンベで十分にお使いいただくことができます。ただし品質に違いがある場合がございますので、仕様の詳細につきましてはガス販売会社にご相談ください。（島津製作所）

Q72：1分析当たりCO₂の使用量はどれくらい使うものなのでしょうか。

A72：1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。（島津製作所）

Q73：HPLCでは試料を移動相に溶かして溶解テストを行うと思いますが、SFCでは事前にどんなテストやチェックが必要でしょうか。

A73：超臨界CO₂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100%に溶解させて使用することが一般的です。（島津製作所）

区分11：その他

**Q74：LCで分析している成分をSFCで分析してみたい、となった場合に、何から検討を始めたらいでしょうか。
(カラムは流用できそうな印象を受けましたが……。)**

A74：最初にカラムを検討し、次に移動相を検討するという流れはLCと特に変わりありません。
先ずはLCで用いられているカラムをベースに検討されることが良いと思います。(島津製作所)

Q75：ベースラインの安定性の得やすさはいかがでしょうか。

A75：検出機構はLCと同じため、特に違いはありません。(島津製作所)

Q76：マニュアルインジェクタは使えますか。

A76：SFCの一般論では使用できますが、安全性の観点も鑑み、弊社ではご用意がありません。
これはサンプルループ内にも加圧された超臨界CO₂が流れますので、その超臨界CO₂を安全に取り除かないと逆流の恐れがあるためです。(島津製作所)

Q77：研究開発を行う上で、SFCを主に使って目的とする成分の分析を行っている研究者はどれぐらいいらっしゃるのでしょうか。

A77：日本国内では2016年11月まで高圧ガス保安法の適用を受けていたため、まだ一般的ではない印象を受けますが、同等の法律がない諸外国では多くの場面で使用されています。(島津製作所)

Q78：

- ・臭いかぎGCのようにBPRの後段でサンプルの取り扱いをすることができるのでしょうか。
(BPRの後ろのサンプルの状態が想像が付きません。)
- ・臭いかぎGCのように分離後の臭いをかくことは可能ですか。

A78：理論上は可能です。ただし、移動相としてガスだけを使用するGCとは異なり、SFCでは液体のモディファイアも使用できますので、この場合は噴霧されるため使用できません。しかしながら、LC同様にフラクションコレクターを使用することが出来ますので、一旦捕集し、安全な状態になった後に臭いを嗅ぐことは出来ます。
(島津製作所)

Q79：「SDGs」にも役に立つと聞いたことがございますが、それはどのように環境に良いのかを教えてください。

A79：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、LCの移動相として使用する有機溶媒は廃棄処理する際に新たなCO₂が産出されます。従いましてLCをSFCへ切り替えることは温室効果ガスであるCO₂の排出量を削減し、SDGsが提唱する「13. 気候変動に具体的な対策」に繋がると考えます。(島津製作所)

Q80：測定終了時に超臨界CO₂はシステムやカラム内に残留しないのでしょうか。

A80：測定終了後に各モジュールを停止すると圧力調整器も停止して内圧が解放されることから、システム内は大気圧となります。CO₂は気化しますので超臨界状態としてシステム内に残留することはございません。
(島津製作所)

Q81：キラル化合物の分取を主目的としてSFCの導入を検討しています。昨今、弊社において有害物質の暴露低減を厳しく言われ、分取関連装置はすべてドラフト等の排気設備のあるところに設置をとということになりました。ドラフトに余裕がないので、セミ分取スケールはあらかじめ分析スケール分取のシステムに申請を変更しようとも思うのですが、それでも許可が得られないのではという意見もあります。

そこで、現SFCユーザーの皆さんの設置場所の状況について教えていただけるとありがたいです。

個人的には分析スケールならフラコレをつけても、排気は分析システムと変わらないのではないかと考えています（HPLCより溶媒使用量が少ないということはHPLCシステムより暴露は少ないのではと思います）。

A81：装置全体をドラフトに入れるか、フラクションコレクタ部分のみをフードで覆い、そこから廃棄ラインをドラフトに引き込む、という2通りの設定方法がございます。

ご指摘の通り、SFCは溶媒使用量はHPLCよりも少ないですが、分析スケールでも少なからずCO₂は廃棄されるため、暴露低減について御社内で規制がある場合、分析スケールでもフラクションコレクタ部はフードで覆うことを推奨致します。（島津製作所）