

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)

Online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography

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

Abstract:

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。オンラインSFE-SFCを用いることで前処理から分析までを自動化することができ、前処理の簡便化や不安定化合物の分析、高感度分析など様々なメリットが生まれます。ここではオンラインSFE-SFCの基本原理から“Nexera UC オンラインSFE-SFCシステム”の特長、抽出分析例についてもあわせてご紹介します。

Keywords: 超臨界流体クロマトグラフィー、SFC、supercritical fluid chromatography、超臨界流体抽出、SFE、supercritical fluid extraction、オンラインSFE-SFC

1. 超臨界流体とは

超臨界流体とは、温度と圧力が臨界点以上である物質の状態のことで、気体様の高い拡散性と低粘性、液体様の溶解性を併せ持っています。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・安価であることからコーヒーの脱カフェインなど工業的に広く使用されています。また、分析分野においても超臨界二酸化炭素を抽出媒体として用いた超臨界流体抽出 (Supercritical fluid extraction: 以下SFE) や、超臨界二酸化炭素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) が使用されています。

SFEは、超臨界流体の高い浸透性と拡散性を利用することで高効率に抽出することが可能です。また、二酸化炭素の臨界温度が低く、温和な条件で抽出に適用できるため、目的成分が分解されにくい条件で抽出を行うことができます。

SFCは、移動相に高い拡散性と低粘性を特長とする超臨界流体を用いることで、従来のHPLC分析と比較してカラムにかかる圧力が低く、流速が早い条件においても分離能が低下しないため、高速分析が可能となります。また、超臨界二酸化炭素の極性は一般的にヘキサン程度といわれていますが、メタノールなどの極性溶媒と混和することで幅広い極性に対応することができるため、疎水

性化合物だけでなく親水性化合物も含めた幅広い化合物の分析に適用できます。

2. オンラインSFE-SFCとは

オンラインSFE-SFCは、SFE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あり、Fig. 1に示すNexera UCオンラインSFE-SFC-MSシステムにより実現することが可能です。

オンラインSFE-SFCは、サンプルを抽出容器に詰める作業のみで、抽出から分析まで自動で行うことができます。抽出物が光や空気に触れることなく分析を行えるため、光に不安定な化合物や酸化しやすい化合物に有用です。また、抽出媒体に水を使用しないため加水分解しやすい化合物にも有用です。その他に、抽出した化合物をすべて検出器に導入し目的成分の負荷量を大きくできるため、高感度分析が可能です。これまで感度不足で濃縮が必要であった成分や量が少ない試料などの分析に有効です。

また、Nexera UCシステムは、ラックチェンジャを使用することで最大48検体のサンプルを搭載することができ、連続多検体処理が可能です。抽出容器は、乾燥ろ紙血 (DBS) など少量サンプル用の0.2 mL容量と農産物など多量サンプル用の5 mL容量の2種類があり、様々なサンプルに対応できます。

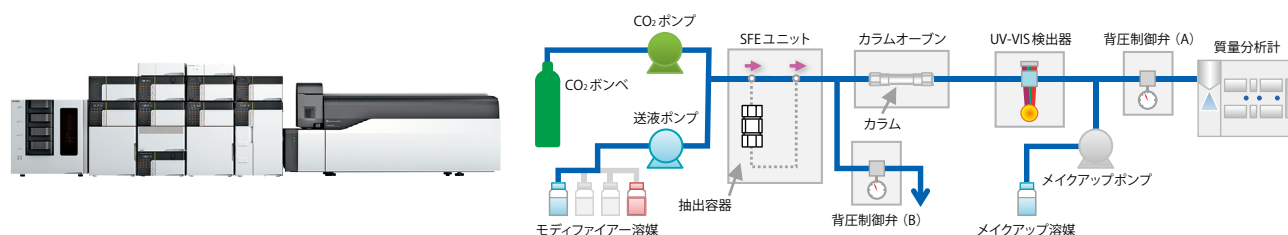


Fig. 1 Nexera UC オンラインSFE-SFC-MSシステム構成・流路図

3. オンラインSFE-SFCの動作原理

Nexera UC オンラインSFE-SFCの抽出分離分析の動作原理をFig. 2に示します。大きく分けて3つの工程で行われます。

(1) 抽出

(1)-1 抽出容器の搬送と温調

指定した抽出容器をSFEユニットに搬送し、設定の温度に達するまで温度調節します。抽出温度は、40～80℃まで設定することが可能です。

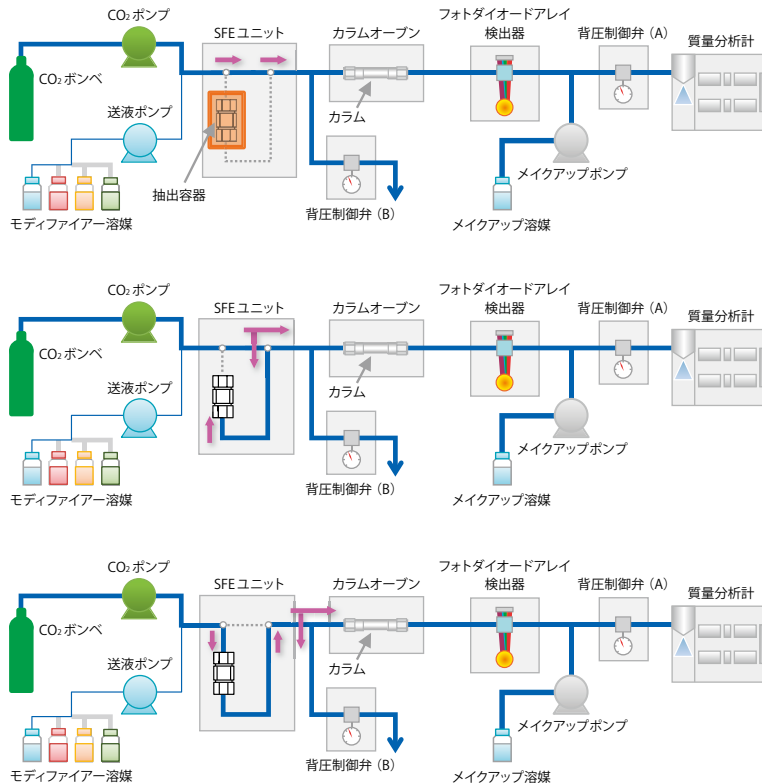
(1)-2 静的抽出 (Static extraction)

抽出容器の温度が所定の温度に達すると超臨界流体を抽出容器に導入します。導入後は抽出容器内には通液は行わず、静置状態で抽出を行います。

(1)-3 動的抽出 (Dynamic extraction)

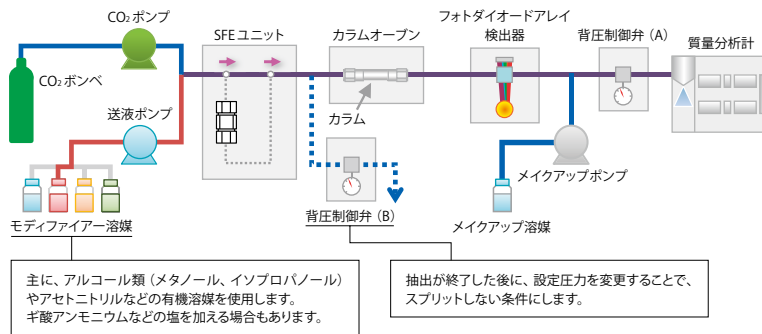
静的抽出の後に抽出容器に超臨界流体を通液しながら抽出を行います。抽出物は抽出容器から取り出され、分析カラムへ導入されます*。

*Nexera UCのオンラインSFE-SFCシステムでは、サンプル濃度が非常に高い場合やマトリックスが多いサンプルを抽出した場合に、抽出物の一部だけをカラムに導入するスプリットを行うことができます。
スプリットの比率は、2つの背圧制御弁の圧力を変化させることで調整することができます。



(2) 分離

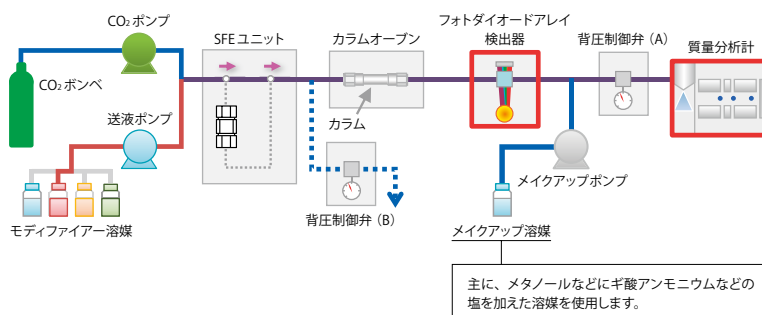
抽出が終了した後に、抽出容器は流路から切り離され、移動相中の Modifier 濃度を増加させることで抽出物の分離を行います。カラムの種類や Modifier の種類によらず、Modifier 濃度が高くなることで溶出力は増加します。Modifier 溶媒は、分離時に抽出溶媒とは異なる溶媒に切り換えることも可能です。



主に、アルコール類 (メタノール、イソプロパノール) やアセトニトリルなどの有機溶媒を使用します。辛酸アンモニウムなどの塩を加える場合もあります。
抽出が終了した後に、設定圧力を変更することで、スプリットしない条件にします。

(3) 検出

溶出した化合物は、フォトダイオードアレイ検出器や質量分析計で検出します。質量分析計を使用する場合、移動相が二酸化炭素が主となる条件ではイオン化するためのイオンが不足し感度が低下するため、メイクアップポンプでイオン化補助用の有機溶媒 (メイクアップ溶媒) を添加します。メイクアップ溶媒には、Modifier と異なる溶媒を使用することができるため、化合物に応じて高感度に分析できる溶媒を選択できます。



主に、メタノールなどに辛酸アンモニウムなどの塩を加えた溶媒を使用します。

Fig. 2 オンラインSFE-SFCシステム動作原理



4. 分析条件について

Nexera UCのオンラインSFE-SFCシステムでは、抽出条件、分離条件を検討する項目として以下の様々なパラメーターがあり、各パラメーターを調整することにより抽出効率や分離の最適化を行うことができます。

抽出条件 (静的抽出、動的抽出共通)	分離条件
<ul style="list-style-type: none"> ・時間 ・温度 ・圧力 ・モディファイアー溶媒の種類 ・モディファイアー添加量 	<ul style="list-style-type: none"> ・カラムの種類 ・モディファイアー溶媒の種類 ・モディファイアー添加量 ・カラムオープン温度 ・BPR圧力

5. 抽出容器について

Nexera UCでは、抽出容器は2種類のラインナップがあり、容量の違いで以下の特徴があります。

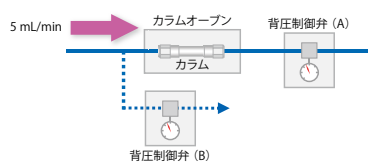
容量	形状	特徴
0.2 mL		容量が小さいため、オンラインSFE-SFC分析時にピークがブロードになりにくい。
5 mL		およそ1gのサンプルを充填することが可能。ただし、容量が大きいため、動的抽出で抽出物を取り出すために時間を要する。

6. スプリット導入によるメリット

Nexera UCのオンラインSFE-SFCシステムでは、抽出容器の容量が5 mLの場合、抽出物の全量をカラムへ導入するとカラム負荷量が大きくなりすぎてピークがブロードになる場合があります。そこで、スプリットを用いて抽出物の一部のみをカラムへ導入することで、負荷量を軽減することができます。さらにカラムへの移動相の流量を減少できるため、カラム先端に目的化合物がとどまりやすい条件にすることができます (Fig. 3)。

スプリットなしの場合

- ・ 負荷量が過大
 - ・ 抽出中も化合物が溶出
- ➡ ピークがブロードになる



スプリットありの場合 (スプリット比 10%)

- ・ カラムへの負荷量を軽減
 - ・ 抽出中、流量の低減により溶出を軽減
- ➡ ピーク形状が改善

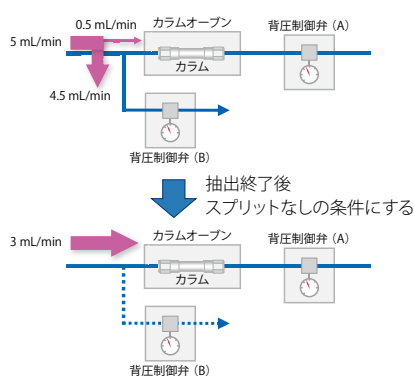
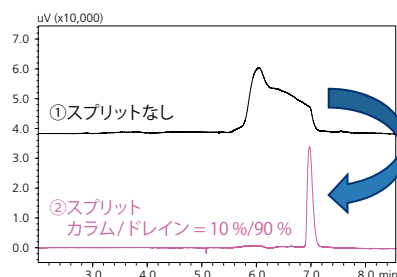


Fig. 3 スプリット導入

スプリットすることで、抽出物の溶出を抑えることができるため、ピーク形状の改善を図ることができます。Fig. 4に カフェインを用いたスプリットの有無による分析例を示します。①スプリットなしの条件では、ピークがブロードになってしましますが、②スプリット導入することで、ピーク形状が改善しています。



抽出容器	: 5 mL
サンプル	: カフェイン
モディファイアー	: MeOH
抽出時間	: 4 min (static 2 min, dynamic 2 min)
モディファイアー比率	: 10% (0-4 min) → 50% (4-6 min)
流量	: 5 mL/min (抽出時)、3.0 mL/min (分析時)
背圧	: 15 MPa
カラム	: Shim-pack UC-SIL 4.6 mmI.D. × 250 mmL, 5 μm
検出	: フォトダイオードアレイ検出器 (@272 nm)

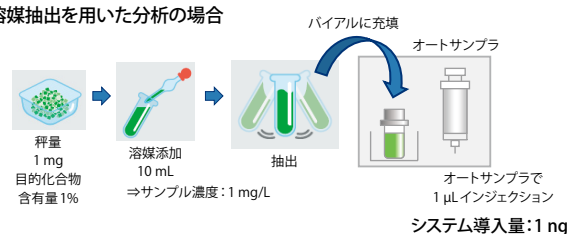
Fig. 4 スプリット導入 カフェイン分析例

7. 高感度抽出分析

従来の溶媒抽出による前処理法では、サンプル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サンプルを分析する場合、感度が足りず、繰り返し抽出操作や濃縮操作が必要になります。一方、Nexera UCのオンライン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、カラムへのサンプル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Fig. 5に示します。Nexera UCで直接サンプルを導入した場合、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%を想定した例

溶媒抽出を用いた分析の場合



Nexera UCを用いた場合

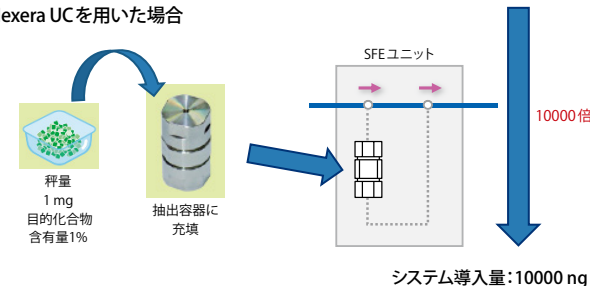


Fig. 5 高感度分析

8. 不安定化合物抽出分析

Nexera UCのオンラインSFE-SFCシステムでは、化学的に安定な二酸化炭素を用いて抽出でき、抽出容器にサンプルを充填してから検出されるまで光にあたることや酸素に触れることがないため、不安定な化合物の抽出分析に効果的です。還元型CoQ₁₀は容易に酸化され、酸化型CoQ₁₀に変化しますが、オンラインSFE-SFCを使用することで、還元型CoQ₁₀を正確に抽出分析することが可能となります (Fig. 6)。

分析条件など詳細はApplication News No. L496をご参照ください。

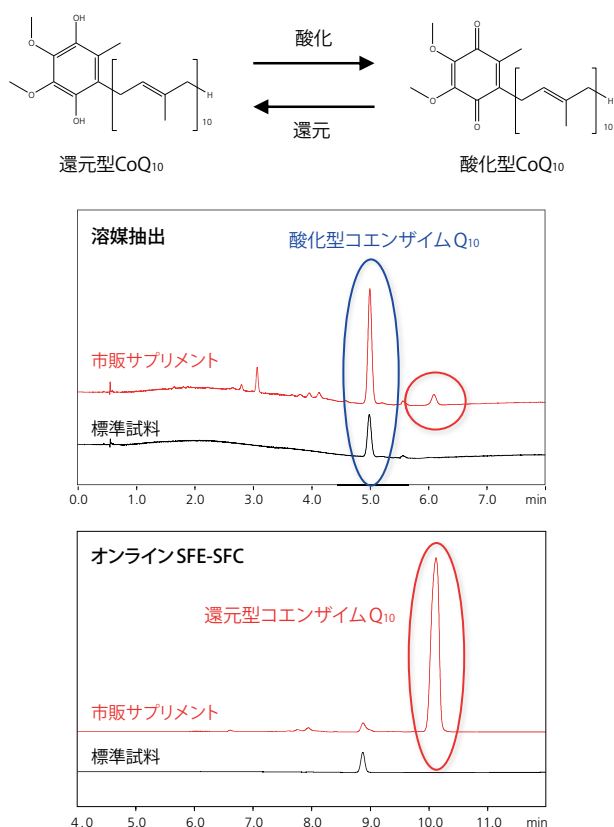


Fig. 6 CoQ₁₀のオンラインSFE-SFCへの適用

9. 前処理の簡便化、多検体処理 残留農薬のNexera UC抽出分析への適用

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、サンプル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。既存の手法としては、有機溶媒を使用した前処理手法が行われていますが、工程が多く、手間と時間がかかります。Nexera UCの前処理では、水分を取り除くための脱水剤を混ぜ、抽出容器に充填するのみで前処理が完了します (Fig. 7)。水分を取り除く理由は、超臨界二酸化炭素が水と混ざらない特性を持つため、水分を含んだ状態では抽出効率が低下する可能性があるためです。実際にオンラインSFE-SFC-MSで分析した農薬分析結果をTable 1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。

また、ラックチェンジャを使用することで、4つの抽出容器を搭載できるラックを12個セットできるため、最大48検体のサンプルを連続して分析することができます。

オンラインSFE-SFCを使用することで、複雑な前処理の工程を簡便化し、作業効率を向上することが可能です。

残留農薬の分析条件や結果などの詳細は、Application News No. L497をご参照ください。

Table 1 典型的な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

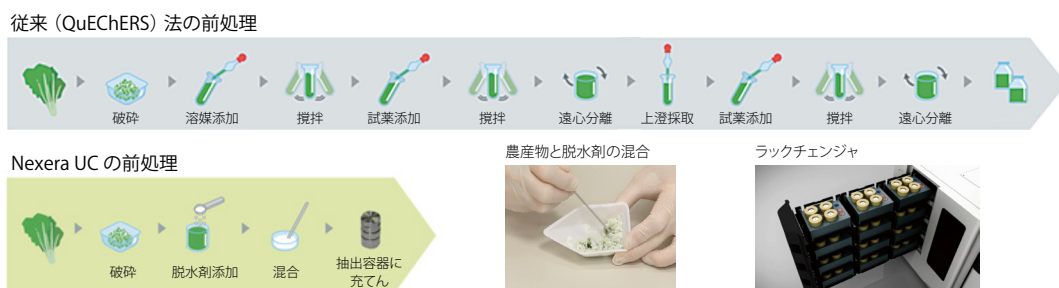


Fig. 7 農薬抽出の前処理の比較

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8月
© Shimadzu Corporation, 2016