

Technical Review

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) の有効的な使い方

堀川 愛晃

Good use of Supercritical Fluid Chromatography

Yoshiteru Horikawa

JASCO Corporation

2967-5 Ishikawa-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-8537, Japan

Abstract

Supercritical Fluid Chromatography (SFC) offers high speed analysis due to high diffusivity of solutes in the low-viscosity supercritical mobile phase. Generally, the separation mode in SFC is regarded as normal phase with a combination of non-polar CO₂ mobile phase and polar stationary phase. Therefore, separation of water-soluble polar compounds is considered to be difficult to separate by using SFC. However, the elution and peak shapes of polar compounds can be improved by adding a small amount of acid, base, volatile salt and ion pair reagent to the modifier solvent such as alcohol.

In chiral preparative SFC, samples are often over-loaded and it is difficult to determine when to start and end fractionation from Ultra Violet (UV) chromatographic data. A Circular dichroism (CD) detector can differentiate enantiomers and generate positive/negative chromatographic peaks. In addition, CD detector can simultaneously generate CD, UV and g-factor signals. The g-factor is a signal defined as CD/UV whose level is independent of the peak concentration but dependent only on enantiopurity. Therefore, enantiopurity of g-factor triggered fractions is very high.

Keywords: Supercritical fluid chromatography, Polar compound, Chiral separation, Circular dichroism, Fractionation

1. 緒言

超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) とは、超臨界流体 (主に二酸化炭素) を移動相として使用するクロマトグラフィーである。充填カラムを用いた SFC は、HPLC から発展した装置の扱いやすさと分離技術の拡張性により、種々の試料の分析に利用され、応用分野が拡大している。医薬品やその光学異性体、脂溶性ビタミン、高分子添加物、オリゴマー、多環芳香族炭化水素、石油製品、脂質、環境汚染物質、農薬、さらに、エッセンシャ

ルオイルなどの揮発性の高い物質も含め、多種類の成分の分離例が報告されている[1,2]。特に、近年では光学異性体の分離・分析、分取精製について多くの研究がある[3]。より詳細な内容については、総説、解説を参照して頂きたい[2-11]。このような分離分析、分取精製法は、海外では環境保全の観点からも注目されて、LC から SFC に切り換えている企業が多く、最近ではアキラル物質の分取にも活用されている。この論文では SFC の基礎や分析、分取の応用例を記述する。

日本分光株式会社

〒192-8547 東京都八王子市石川町2967-5

Tel: 042-646-4119

Fax: 042-660-7513

E-mail: yoshiteru.horikawa@jasco.co.jp

2. 超臨界流体クロマトグラフィー

2.1 超臨界流体クロマトグラフィーシステム

Figure 1 は充填カラムを使用した SFC に使用される典型的な装置構成例である。移動相は、ポンプにより加圧された流体が液体状態で送液され、オープン内で予備加熱後にインジェクタを通過しカラム、検出器に入る。SFC では、セルの出口側に背圧をかけるため、光学検出器に使用するセルは、高い耐圧性能が必要となる。流路の最後には、超臨界状態を保つために、圧力制御弁または抵抗管が接続される。検出時に大気圧、または、それ以下の減圧状態にする必要がある水素炎イオン化検出器 (FID)、質量検出器 (MS)、蒸発光散乱検出器 (ELSD)、荷電化粒検出器 (CAD) などは、スプリッターを用いる方法によって、溶出成分の一部を検出器に導入する。検出器の種類によっては、スプリットした後に、検出器の感度の向上、配管内の試料の析出による閉塞を防止するためにカラムの出口よりも下流で溶媒を足すことがある。その溶媒をメイクアップ溶媒と呼ぶ。分取の場合は、回収率の向上のために、メイクアップ溶媒を使用する。メイクアップ溶媒を送液するためのポンプは目的によって流路への接続の場所が変わる。例えば、分取物の回収率の向上の場合は、検出器と圧力制御弁の間に接続する。

SFC-MS は、GC-MS、LC-MS と同様に分離した成分の定性情報を得ることができる強力な検出器となる。分離した成分や移動相条件によって、インターフェースおよび、イオン化法を選択する必要がある。基本的には、SFC では、LC-MS 用のインターフェースがほとんど利用できるが、イオン化を促進させるためにメイクアップ溶媒を送液することが、必要な場合がある。

2.2 分離特性と能力

SFC の移動相溶媒として超臨界流体を用いた場合は、物性値が、液体よりも低粘度、高拡散係数であるため、カラム内の移動相の流速を速くしても高い分離効率を維持できると

いう特長を有する。Figure 2 にフラバノンの光学分離を行った時の HPLC と SFC を比較した H-u 曲線を示す。ここでの Peak 1 は最初に溶出したピークで、Peak 2 は二番目に溶出したピークである。HPLC の場合、線流速 u を速くすると、理論段高さ H は、高くなり、カラム効率が悪くなることが分かる。一方、SFC では線流速を速くしても、理論段高さはあまり変化しない。従って、HPLC よりも短時間・高速分離が実現できる分離技術としての能力を備えている。また、超臨界流体は、密度を気体から液体に近い高い状態まで、圧力を操作して連続的に変化させることができる。すなわち、分離の操作パラメータの一つに、カラム内の圧力を利用することが可能である。さらに補助溶媒 (エントレナー、モディファイヤー、ソルベントとも呼ばれる) として使用する有機溶媒と混合して、保持時間や分離の調整にも利用できる。補助溶媒として使用する各種有機溶媒との混合は、移動相溶媒の極性の調節が可能となるため、分析対象成分を広げることができる。このような特性から、GC よりも温和な測定条件下で、GC では分離不可能な揮発性成分や熱的に不安定な成分などの分離にも適用できる。

2.3 二酸化炭素を使用した SFC の特徴

SFC の移動相として、二酸化炭素を利用することは、比較的扱いやすい臨界温度 (31.3°C) と臨界圧力 (7.38MPa) で超臨界状態となり、アルコールなどの種々の有機溶媒と混合できる物質であること、毒性がほとんど無く、化学的に不活性であり、高純度なものが、安価に市販されているなどの多くの利点を有するためである。さらに、二酸化炭素は、液体または超臨界流体となっている加圧下から大気圧へ減圧するだけで、気体になってしまう。この特性は、分離成分の分取精製時の後処理工程を短縮化できる特長となっている。

超臨界二酸化炭素は、極性がヘキサンと同等レベルのため、親油性物質の分離には向いている。シリカカラムを使用すると、順相クロマトグラフィーとしての保持挙動を示すこ

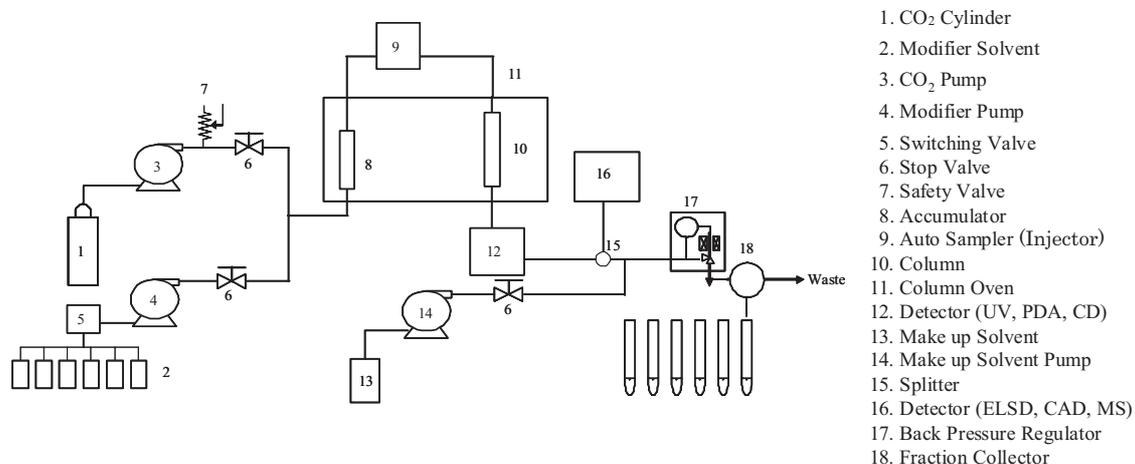


Figure 1 Hydraulic diagram of Typical SFC System.

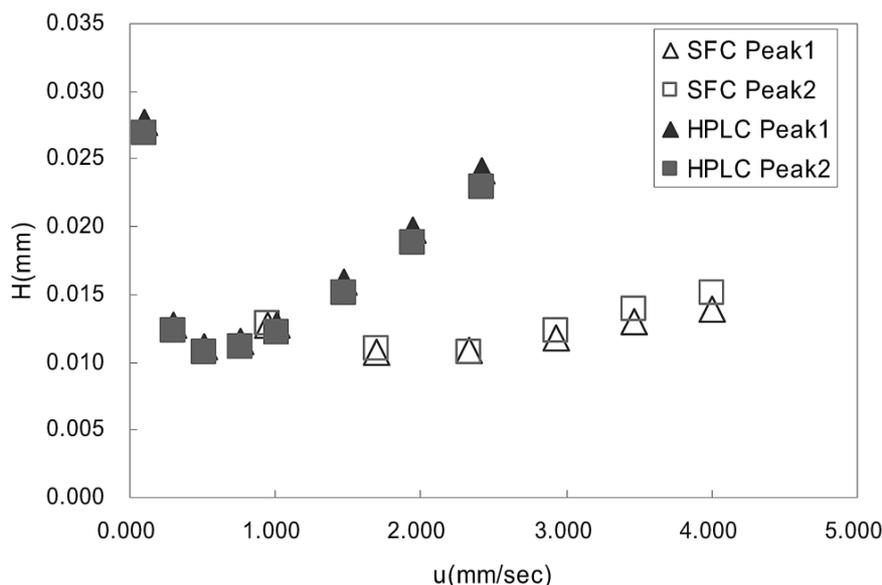


Figure 2 H-u curve for SFC and HPLC.

SFC conditions are: column: CHIRALCEL AD-H (5 μ m, 4.6 mm ID \times 150 mmL), mobile phase: HPLC; n-Hexane/EtOH (90/10), SFC; CO₂/EtOH (90/10), total flow rate: HPLC; 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.3, 0.1 mL/min, SFC; 3.6, 3.2, 2.6, 2.0, 1.4, 0.8 mL/min, column temperature: 40°C, pressure: 20 MPa, wavelength: 250 nm, sample: 1 mg/mL Flavanone in MeOH, injection volume: 5 μ L.

とが知られている。極性が高い物質の場合は、モディファイヤー溶媒の割合を増やす必要もある。そのため、一般的に使用されている条件 (40°C、10~20MPa、モディファイヤーの割合10~50%) は亜臨界の状態で行っている場合が多い。総称として超臨界流体クロマトグラフィーと呼んでいるが、実際は液化二酸化炭素を主溶媒とするカラム背圧制御型高速流体クロマトグラフィーと呼んだ方が適切だと思われる。

2.4 SFCのカラムと分離パラメータ

2.4.1 カラム

SFCで使用できるカラムはシリカゲル、シリカゲルベースの化学結合型充填剤 (C₁₈、C₈、C₄、C₁、フェニル、C₃₀)、シアノプロピル (CN)、アミノプロピル (NH₂)、ジオール (DIOL)、2-エチルピリジン、4-エチルピリジン、光学異性体分離カラム等がある。ポリマー系のカラムは超臨界CO₂により、膨潤・収縮を起こし、性能を低下する可能性があるため、注意が必要である。Figure 3に4種類のカラムによる7種類の極性物質の分離挙動の違いを示す。CNカラムの保持能力が一番低く、次にDIOL、シリカカラムとなっている。一方、NH₂カラムは他のカラムと保持挙動が異なり、塩基性物質の保持が短く、酸性物質の保持が強くなる。従って、試料の酸性度、塩基性度に保持挙動が依存する。

2.4.2 分離パラメータ

分離するパラメータには、圧力、温度、モディファイヤーの種類と量がある。なお、これらのパラメータを変化させる

グラジエント溶出法を用いて、分離の改善を行うこともできる。温度と圧力は超臨界CO₂の密度に影響する。低温高压にすることで、移動相の流体の密度が高まり、溶出力を増加することができる。ただし、超臨界CO₂の極性は低いので、一般的なSFCの条件にはモディファイヤーを加えている。SFCで使用できるモディファイヤーと添加試薬をTable 1に示す。モディファイヤーの選択には以下の2つの点を注意する。1つは超臨界CO₂に対して、相溶性があることが必要である。相溶性がない水をモディファイヤーとして加えると、相の状態が液体と超臨界相の二相になり、検出ノイズの増大や溶媒時間の再現性の低下などを引き起こすことがある。もう1つは目的成分を溶解する溶媒であること、CO₂だけでは溶解しない成分でもモディファイヤーの割合を上げることで、溶解させ、測定可能になる。

極性成分の分離は、モディファイヤーの使い方やカラムの選択によって可能になる。アルコールなどのモディファイヤー溶媒に少量の酸、または塩基、揮発性の塩やイオンペア試薬 (Table 1を参照) を加えることで極性物質の分離、ピーク形状の改善もできる。しかし、添加試薬を使用した場合は、カラムへの添加試薬の履歴による影響に注意が必要である。充填剤に対しての平衡化に時間が必要であり、条件検討時に再現性の確認を的確に行うことである。添加試薬入りのモディファイヤー溶媒を事前に流すことにより、平衡化の時間を短縮することができる。

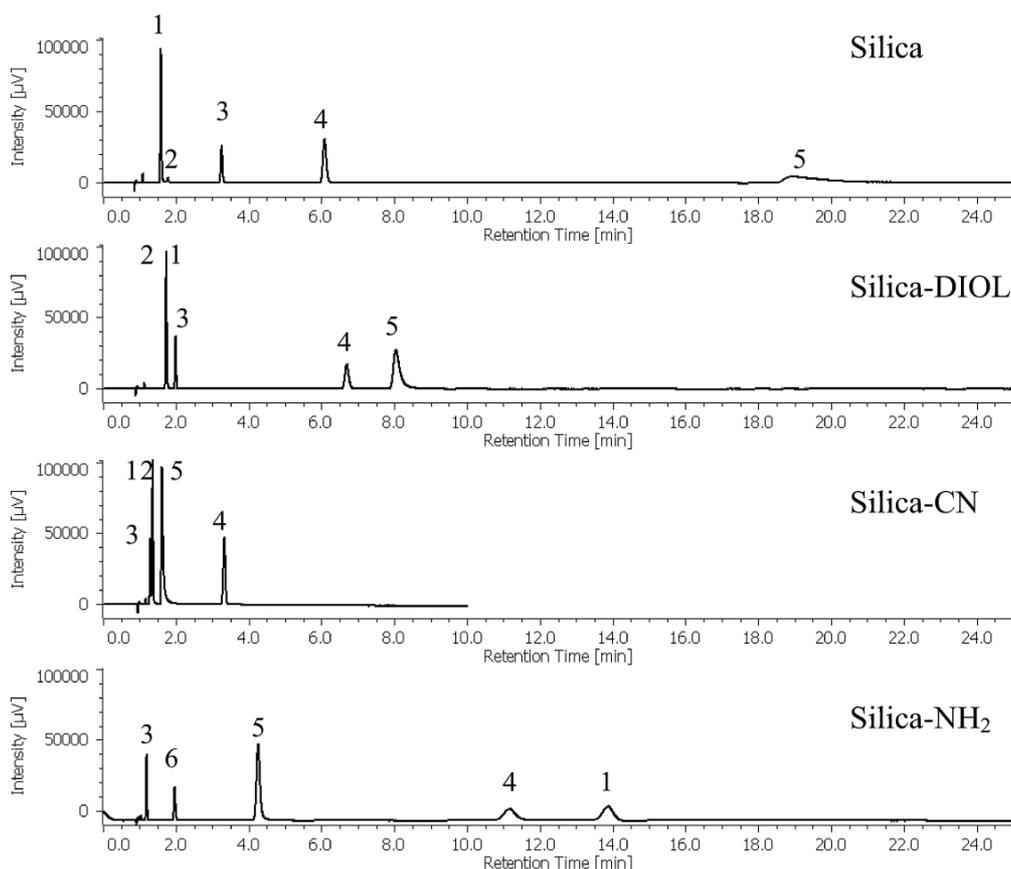


Figure 3 Chromatograms of 6 polar compounds in silica and silica based columns.

1. Flurbiprofen, 2. Acetylsalicylic acid, 3. Caffeine, 4. Sulfamethoxazole, 5. Adenine, 6. Amitriptyline.
SFC conditions are: columns, Silica (SFCpak SIL-5), Silica-DIOL (SFCpak SIL DIOL-5), Silica-NH₂ (SFCpak SIL NH₂-5), Silica-CN (SFCpak SIL CN-5) 4.6 mm ID×250 mmL, 5 μm, CO₂ Flow Rate: 3.0 mL/min, MeOH Flow Rate: 0.5 mL/min, temperature: 40°C, pressure: 20 MPa, wavelength: 220 nm, concentration: 0.1 mg/mL, injection volume: 5 μL.

Table 1 Using modifier solvents and additives for Supercritical fluid chromatography.

モディファイヤー溶媒	添加試薬
メタノール	ギ酸
エタノール	酢酸
イソプロピルアルコール	トリフロロ酢酸
n-ヘキサン	ジエチルアミン
イソオクタン	ジイソプロピルアミン
酢酸エチル	トリメチルアミン
アセトン	トリエチルアミン
アセトニトリル	アンモニア
ジクロロメタン	酢酸アンモニウム
クロロホルム	MS用イオンペア試薬
テトラヒドロフラン	ジ(2-エチルヘキシル)
1,4-ジオキサン	スルホはく酸ナトリウム
ジエチルエーテル	
ジイソプロピルエーテル	
ジメチルホルムアミド	
ジメチルスルホキシド	

2.5 SFCの分離条件の探索方法

SFCの分離条件を探索する場合、始めにカラムを選択し、モディファイヤーの割合を10~50%まで溶媒グラジエントを行い、溶出することを確認する。溶出しない場合は、違うカラムを選択し、溶出挙動を確認する。ピークが多数で、分離しない場合は温度、圧力を変化させる。極性が高い試料の場合は添加試薬をモディファイヤーに入れて、ピーク形状の改善や溶出促進を促す。ただし、分離だけではなく、分取を行う場合は後処理のことも考えて、添加試薬を選択することが必要である。

3. 分析SFCの応用例

SFCは、HPLCに比べて、短時間分離、有機溶媒量の低減が期待でき、ランニングコストが低く、効率の高い分離分析を実現できる。医薬品分野では、SFCの適用性が認められている。分離例として、Figure 4に医薬品成分の11種類を分離したクロマトグラム、Table 2に分離条件のモディファイヤー溶媒のグラジエント条件を示す。極性物質でもSFCで

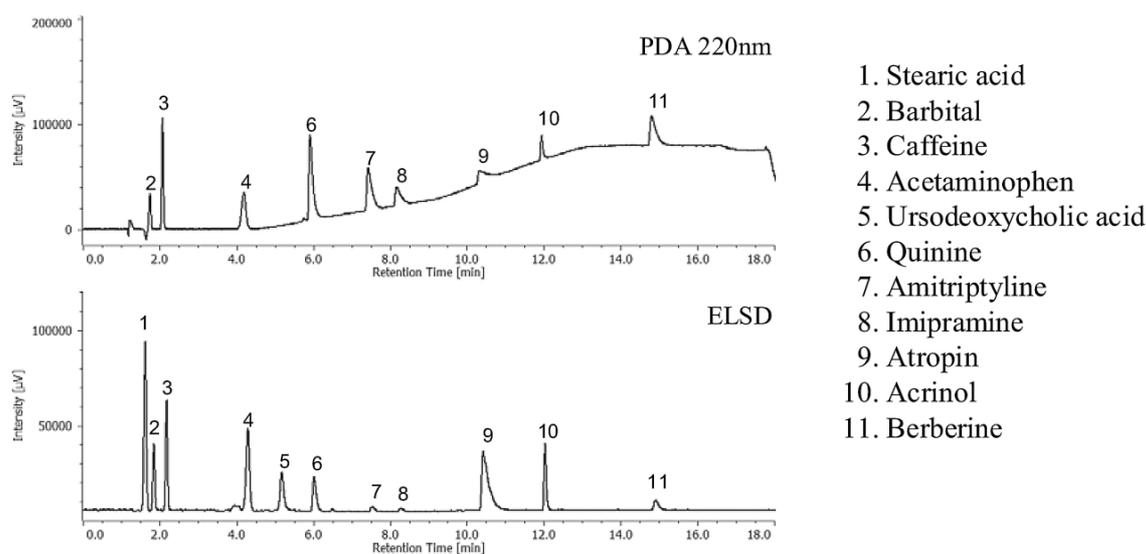


Figure 4 Chromatogram of 11 polar compounds.

SFC conditions are: column: Silica (4.6 mm ID×250 mmL, SFCpak SIL-5), mobile phase: carbon dioxide and modifier; 20 mM ammonium acetate in Methanol, CO₂ Flow rate: 3.0 mL/min, modifier Flow rate is Table 2, column temperature: 40°C, pressure: 25.0 MPa, splitter: 50 μm I.D.×50.5 cmL, concentration: each 0.1 mg/mL in Methanol (Atropin: 0.5 mg/mL), injection volume: 10 μL, ELSD: Evaporator temperature ; 40°C, Nebulizer temperature ; 40°C, N₂ gas; 1.60 SLM.

Table 2 Modifier solvent gradient condition for Figure 4.

Gradient condition		0.00	2.5	8.0	12.0	16.5	16.55
min		0.00	2.5	8.0	12.0	16.5	16.55
mL/min		0.3	0.3	0.8	2.0	2.0	0.3

分離検出することができる。次にそれらの極性物質が含まれている市販の下痢止め薬4種類と風邪薬のクロマトグラムをFigure 5に示す。分離条件はFigure 4と同じ分離条件で行った。下痢止め薬には、フォトダイオードアレイ検出器(PDA)で、AcrinolとBerberineの2成分が、Stearic acid、Ursodeoxycholic acid、Acrinol、Berberineの4成分がELSDで検出できた。風邪薬では、CaffeineとAcetaminophenの2成分が両方の検出器で検出できた。SFCもHPLCと同等のレベルで分離分析に適用することが可能である。

4. 分取SFCの応用例

SFCを用いたキラル分離は、2.2章に記述したように超臨界流体は、移動相流体の高拡散係数、低粘度という特性からHPLCよりも短時間で、高効率で分離できること、価格の高い有機溶媒の使用量の削減、分取後の溶媒除去の後処理が容易などの利点からキラル物質の分取精製に多く利用されている。ここでは、円二色性検出器を用いた分取SFCシステムによるフラバノンの光学分割と効率的分取精製法を紹介する。円二色性検出器(CD)はクロマトグラムのピークの極性からプラスとマイナスの応答が発生し、光学異性体を識別

することができる。それに加えて、CD検出器は同時にCD、UV、g-ファクターの信号が得られる。g-ファクターはCD/UVの値で定義され、濃度に依存せず、光学純度だけに依存する。従って、g-ファクターでモニターする方法は、光学純度によるフラクションの適切な分画位置を正確に制御できるため、高純度な光学異性体成分を効率的に回収することができる。また、g-ファクターは、CD/UVの比を表し、レシオクロマトグラムと同様に一定の比の値で出力されるため、台形の形状となる。UV信号とg-ファクター信号で分取時のクロマトグラムをFigure 6に示す。UV信号のクロマトグラムで分取した場合、Fraction 1、2の光学純度は98.1%、92.1%と純度が低い。一方、g-ファクターの信号を用いた時の分取では、Fraction 1、3の2つのフラクションの光学純度はどちらも99.9%以上になり、Fraction 2をリクロマトすることにより、回収率も90%以上と良好な結果となった。

5. まとめ

多くの利点を有し、分析から分取まで幅広く利用できるSFCは、環境に優しいクロマトグラフィーとして、応用が広がっている。有機溶媒の規制が厳しくなっていく中でSFCの優位性が高まり、高圧ガスの規制緩和が進み、国内でもより多く利用されることを期待している。

文献

- [1] Harris, C. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 87A-91A.
- [2] Guiochon, G.; Tarafder, A. *J. of Chromatography A*, **2011**,

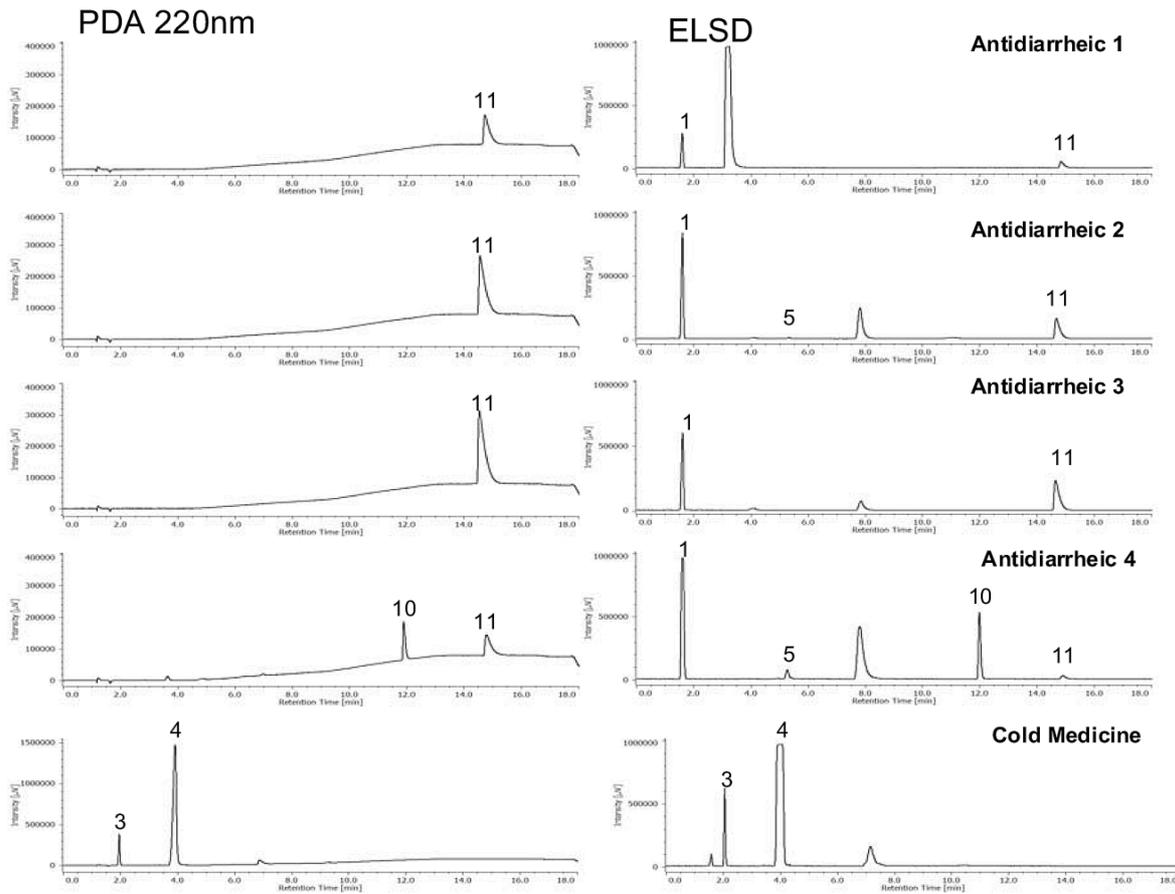


Figure 5 Chromatogram of 4 anti-diarrheics and cold medicine. Elution conditions are identical to those given in Figure 4 caption.

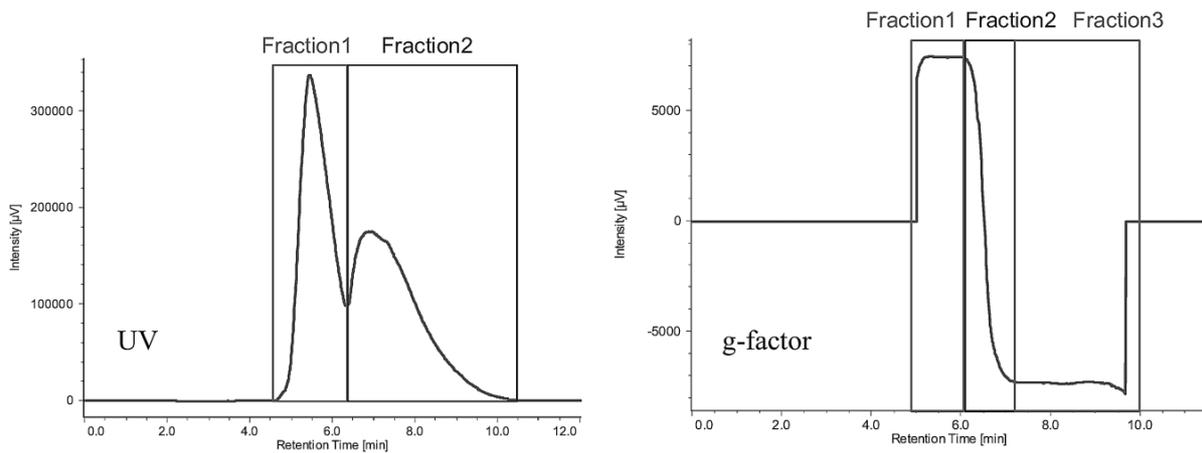


Figure 6 Chromatograms of UV-triggered and g-factor-triggered fractionation. Elution conditions are: column, CHIRALPAK IA (20 mm ID×250 mmL), CO₂ flow rate: 21.5 mL/min, Modifier, methanol flow rate: 3.5 mL/min, column temperature: 40°C, pressure: 20 MPa, wavelength: 310 nm, sample, 30 mg of flavanone.

- 1218, 1037-1114.
- [3] 坊之下雅夫, 堀川愛晃, *ぶんせき*, **2009**, *12*, 669-677.
- [4] Taylor, L. T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4285.
- [5] Chester, T. L.; Pinkston, J. D.; Raynie, D. E. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 487R.
- [6] Chester, T. L.; Pinkston, J. D.; Raynie, D. E. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4606.
- [7] Henry, M. C.; Yonker, C. R. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3909.
- [8] Randall, L. G. *Sep. Sci. Technol.* **1982**, *17*, 1.
- [9] Saito, M.; Yamauchi, Y.; Okuyama, T. Fractionation by Packed-Column SFC and SFE; VCH Publishers, Inc. **1994**.
- [10] Smith R. M. 超臨界流体クロマトグラフィー 化学と生物実験ライン, 47; 廣川書店, 2001.
- [11] Anton, K.; Berger, C.; Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns, Marcel Dekker, Inc., 1997.