|||||||
実験技術講座

|||||||
質量分析法の最新技術

SFE/SFC-MS

市川 千種^{1,*}, 堀江 真之介^{2,**}, 久保田 諒^{1,***}

¹株式会社島津製作所

²日本ウォーターズ株式会社

(2016年7月5日受理)

SFE/SFC-MS

Chigusa ICHIKAWA,¹ Shinnosuke HORIE² and Ryo KUBOTA¹

¹SHIMADZU Corporation, Kanda nishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8448, Japan

²Nihon Waters K.K., Kitashinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001, Japan

Keywords: Supercritical Fluid, Supercritical Fluid Extraction: SFE, Supercritical Fluid Chromatography: SFC, Preparative-SFC, Online-SFE-SFC-MS.

はじめに

超臨界流体 (Supercritical Fluid) は、工業的に広く用いられており、中でも超臨界二酸化炭素や超臨界水、超臨界アルコールは、以前より PCB など難分解性有害物質の分解や、コーヒー豆からの脱カフェイン、ホップエキスやフレーバー等の天然物の抽出など様々な分野で活用されている。分析分野でも、超臨界流体抽出 (Supercritical Fluid Extraction: SFE) や超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography: SFC) などの分析システムにおいて、取扱が容易である超臨界二酸化炭素が用いられている。超臨界流体の気体と液体の両方の性質を持つ特長により、SFE では抽出効率や生産性の向上、SFC では高分離かつ高速化が可能であるなどの利点があり、また従来法で使用されている有機溶

媒を超臨界流体に置き換えることで、環境負荷とコストの削減が可能となる。ここでは超臨界流体を用いた分析技術として、SFE, SFC の概要とそれぞれの分析システムについて紹介する。

1. 超臨界流体を用いた分析技術

1.1. 超臨界流体の概要

超臨界流体とは、図1に示すように圧力と温度が臨界点を超えた物質の状態であり、気体と比べ高溶解性であり、液体と比べ高拡散性・低粘性である等の、気体と液体の両方の性質を持ち合わせている。物質により臨界点は様々だが、二酸化炭素の臨界温度は31.1°C、臨界圧力は7.38 MPaと低いため、多くの分野で活用されている。分析の分野でも、超臨界流体二酸化炭素は、取り扱いが容易であることに加え、化学的に不活性で不燃である、比較的安価に入手できる、毒性がほとんどなく環境への負荷が少ないなどの利点から、SFE の抽出溶媒や、SFC の移動相に活用されている¹⁾。

1.2. SFE の概要

HPLC, GC, SFC などを用いた分離分析では、試料から目的成分を効率的に抽出する前処理操作が求められている。

* 〒101-8448 東京都千代田区神田錦町1-3

E-mail: ichikawa@shimadzu.co.jp

** 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル

E-mail: Shinnosuke_Horie@waters.com

*** 〒101-8448 東京都千代田区神田錦町1-3

E-mail: r-kubota@shimadzu.co.jp

© 日本農薬学会

図1. 物質の状態図

SFEは超臨界流体の高い溶解性や浸透性などの特長により、試料から目的成分を高い効率で抽出することが可能である。超臨界二酸化炭素は、臨界点が低く、温度的に温和な条件下で抽出が行われるため目的成分が変性しにくく、また平常状態では気化するため、抽出後に、HPLC、LC-MS、GC、GC-MSやNMRなど様々な機器分析に供する際、適した試料に処理することが容易である。その際に使用する有機溶媒量は、溶媒抽出法と比較して非常に少なく、廃棄による環境負荷やコストの削減に有効である。試料中に水分が含まれる場合、水と超臨界流体二酸化炭素は混和しないため、抽出効率の悪化や再現不良につながる。そのため水分が多い試料については、あらかじめ脱水剤と混合してから抽出容器に入れることで、安定的な抽出を行うことが可能となる。また二酸化炭素はヘキサンと同程度の低極性であるため、疎水性化合物の抽出に適しているが、親水性の高い化合物においても、抽出時にモディファイアーとしてメタノールやエタノールなどの極性溶媒を添加することで適応が可能となる。抽出効率を改善する条件としては、モディファイアーの種類のほか、温度、圧力等があげられる。また一般的に試料の形態は、溶媒抽出法と同様細かく粉碎することで抽出効率が高くなる場合が多いが、超臨界流体の特性により、試料をそのまま抽出容器に入れても一定の抽出が可能なる場合もあり、試料の粉碎により分解や変性する物質に有効である。

1.3. SFCの概要

SFCとは主たる移動相として超臨界流体を用いた分離分析手法であり、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、かつカラム効率を損なうことなく高速分析を可能としている。そのため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を実現することができる。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、図2に示すように分離を改善しつつ高速化も達成

図2. SFC条件とHPLC条件の比較

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る。また、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可能である。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である。前述の通り、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するが、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ない。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る。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る。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ている。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する。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る。LC-MSと比較し、SFC-MSでは移動相として用いる二酸化炭素が気化し、試料濃縮が起こるため、高感度に検出可能な場合がある。また移動相のみではイオン化効率が悪い場合は、イオン化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る。

2. 超臨界流体を用いた分析システム

2.1. SFEシステムの概要

SFEシステムでの抽出物の回収方法には様々な手法があるが、ここではトラップカラムを用いたシステムを一例として紹介する。装置構成と抽出工程を図3に示す。このシステム

- (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する

- (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導入する。導入後は抽出容器内には通液は行わず、静置状態で抽出する。

- (3) 動的抽出 (Static extraction)
抽出容器に超臨界流体を通過して動的に抽出する。抽出物は溶出容器から取出され、背圧制御弁の後段にあるトラップカラムでCO2が気化した大気圧状態で捕集される。

- (4) トラップカラムからの溶出と抽出物の回収
トラップカラムから溶出液を送液ポンプを用いてトラップカラムに通液して、抽出物を溶出させ、フラクションコレクタで回収する。

図3. SFEシステム例 (流路と抽出工程)

代表的な農薬成分における抽出操作の再現性と回収率

Compounds	Repeatability (%RSD, n=6)	Recovery (%)
Cyhalofop-butyl	4.2	93
Etofenprox	3.8	90
Iprodione	2.5	93
Malathion	3.2	93
Piperonyl butoxide	3.8	89

玄米抽出液のMRMクロマトグラム

図4. オフライン SFE+GC-MS 分析例

は、二酸化炭素用の送液ポンプ、抽出ユニット、圧力をコントロールする背圧制御弁と抽出物を保持するトラップカラムとカラムからの溶出液を分取するフラクションコレクターから成る。試料を詰めた抽出容器を抽出ユニットにセットし、容器温度が設定値に達した後、容器内に超臨界流体を導入し、静置状態で抽出（静的抽出）を行う。その後、容器内に通液を行いながら抽出（動的抽出）を行い、この工程により、抽出物は背圧制御弁の後段にある、トラップカラムに導入される。背圧制御弁以降は大気圧に近い圧力状態であるため、二酸化炭素が気化し溶解性を失い、抽出物はトラップカラムに捕集される。動的抽出終了後、トラップカラムに溶媒を送液し、抽出物を溶出させフラクションコレクターで分取管に回収する。本システムでは多検体を一度にセットすることができるため、自動で連続的な前処理が可能であり、作業と人為的ミスの軽減に役立つ。玄米試料を用いた農薬の分析例を示す。粉碎処理を行った玄米を脱水剤と混合して抽出容器に封入し、本システムで抽出後にGC-MS/MSで分析を行ったところ、301成分において良好な回収率が得られた（図4）。

SFC-UVシステムの流路

SFC-MSシステムの流路

図5. SFCシステム例

2.2. SFCシステムの概要

2.2.1. 基本システム

図5にSFCシステムの一例を示す。このシステムでは、HPLCシステムを基本構成として、二酸化炭素用の送液ポンプと移動相の気化を防ぐために必要な背圧制御ユニットが追加されている。モディファイア送液用のポンプやカラムオープン、UVまたはPDAや質量分析計などの検出器は、HPLCで使用されているものと同じユニットを用いることができる。本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可能である。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分析が実現可能である。また本システムの応用システムとして、スクリーニングシステムを構築することが可能である。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条件を変更し、網羅的にデータ採取することができる（図6）。また移動相ブレンディング機能により、4種類のモディファイア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、光学異性体分離など分析種に合わせた多種多様な条件検討が必要な分析において、ワークフローを大幅に低減することが可能である。

2.2.2. 分取SFCシステム

LCやLC-MSは分析のみならず、分取精製にも用いられているが、移動相に二酸化炭素を用いるSFCやSFC-MSも同様に分取精製に用いることができる。試料をカラムで分離した後、UVやPDA検出器のほか、質量検出器で検出し、検出器のピーク情報に基づきフラクションコレクターなどの分取容器に捕集する一連の流れもLCやLC-MS分取と同様である。「1.1 SFCの概要」で述べた通り、SFCでは移動相は同

図6. スクリーニングシステム流路

図7. 相補的な選択性により逆相HPLC-MSでは分取できなかった化合物を順相的な保持挙動を示すSFC-MSで分取した事例

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。順相的な保持挙動をする際は逆相HPLCと相補的な選択性を示すことから、逆相HPLCでは分離・分取できなかったピークをSFCで分離、分取する事例も見られる(図7)。しかも、二酸化炭素は常温・常圧の環境下では気体になるため、分取溶液の一部は捕集時点ですでに気化し、精製後の作業効率も向上する。SFCが逆相的な保持挙動を示すこともあるため、逆相HPLCから移行することもあるが、SFCでは捕集した溶液には水が基本的に含まれない。そのため、蒸発乾固が容易になるだけでなく、温度を低く抑えることができるため、熱による捕集した化合物への影響が低減される。一方で二酸化炭素の気化はフラクションコレクターの

ノズルにて噴霧してしまうことにもつながり、危険性が懸念される。しかしながら、現在は分取精製を安全に行うことができるようメーカー各社が独自の対策を講じたシステムを供給しており、最近ではLC分取システムと同じフラクションコレクターを搭載したSFC-MS分取システムも登場している。さらに、移動相の使用量が多い分取用途において、SFCがもたらす有機溶媒の使用量削減効果は大きく、順相HPLCからSFCへ移行する場合においてはその効果は絶大である。

2.3. オンラインSFE-SFC-MSシステムの概要

SFEとSFCをオンラインで接続し、抽出前処理からカラム分離・検出までの分析操作を同一のワークフローで実施することが可能なシステムである(図8)。前述のSFCシステム

図8. オンラインSFE-SFC-MSシステム例

図9. コエンザイムQ10の分析例

をベースにSFEユニットを追加し、抽出した対象物を分離カラムに導入し、分離後MSで分析を行う。試料を抽出容器に詰める工程のみで前処理作業は終了するため、生産性が向上し前処理工程における作業の軽減や人為的ミスといったリスク回避に有効である。また一連の作業がシステム内で遮光無酸素・無水条件下で行われるため、手作業による前処理では分解や変性していた化合物を安定的に分析することが可能である²⁾。一例としてコエンザイムQ10の分析例を図9に示す。このように酸化されやすい化合物についても、試料中の状態を保ったまま検出することが可能である。さらに本システムは、抽出物を全量検出器に導入することができるため、少量の試料で高感度分析が可能である。従来のLC-MSやGC-MSを用いた分析において直面していた煩雑な前処理操作、対象成分の変性や分解、検出感度不足など様々な課題を解決するシステムであり、多岐に亘る分野で有用である。

おわりに

SFE, SFCは、超臨界流体にモディファイアーを加えることで、幅広い化合物への適用が可能である。また超臨界流体の特性により、SFEでは従来法と比較して簡易で効率的な抽出が可能となり、SFCではHPLCとは異なる分離挙動を示し高速分析化など生産性向上にも役立つ。有機溶媒使用量を減らすことができるため、コスト・環境負荷低減にも有効である。これらの技術はシステムの向上により作業の自動化が可能であり、今後多くの分野で活用が期待される。

引用文献

- 1) M. Caude and D. Thiebaut: "Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction", Hardwood Academic Publishers, 1999.
- 2) A. Matsubara, K. Harada, K. Hirata, E. Fukusaki and T. Bamba: *J. Chromatogr. A* **1250**, 76-79 (2012).

略歴

市川千種 (いちかわ ちぐさ)

生年月日: 1979年10月30日

最終学歴: 日本女子大学理学部物質生物科学科

研究テーマまたは主な職歴: 残留農薬分析業務を経験後、2008年島津製作所入社

趣味: 映画鑑賞

堀江真之介 (ほりえ しんのすけ)

生年月日: 1975年8月12日

最終学歴: 近畿大学理工学部化学科

研究テーマまたは主な職歴: 2002年よりSFCに携わり、2009年日本ウォーターズ入社

趣味: 野球観戦, 旅行

久保田 諒 (くぼた りょう)

生年月日: 1984年9月6日

最終学歴: 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了

研究テーマまたは主な職歴: 2009年(株)島津製作所入社

趣味: 硬式テニス

PTV (Programed Temperature Vaporizer) 法

食品中の残留農薬分析や環境中の有害物質分析では、対象成分の毒性の強さから、極めて低い濃度の成分分析に対応することが求められている。PTV (Programmed Temperature Vaporizer) 法はキャピラリガスクロマトグラフィー (GC) の試料注入法の一つであり、農薬など熱に不安定な化合物の分析に適していると共に、試料の大量注入が可能で容易に高感度化が図れることから、高感度分析に対応するための手法の一つとして知られている。ここでは、PTV法の概要について紹介する。

PTVの構造と特徴

PTVは試料気化室が冷却可能でプログラム昇温できるヒーターを有しており、試料気化室内にインサートを用いて、スプリット注入が可能な構造となっている¹⁾。PTVの特徴として、①試料気化室温度が低い状態で試料導入できるため、分解しやすい熱に不安定な化合物の分析に適している、②インサートを使用するため不揮発性成分によるカラムの汚染が低減できる、③スプリット／スプリットレス注入法どちらも使用可能で、高濃度・低濃度試料の分析に対応できる、④スプリット流量の制御により大量試料導入ができる、などが挙げられる。

図1. PTVの構造

PTVによる大量試料導入法

PTVを用いた大量試料導入法は、ガラスインサートにシリカウールや、Tenaxなどの充填剤を詰めたもの、または胃袋型など特殊な形状のインサートを用い、試料中の溶媒成分の大部分を除去し、目的成分のみを分析カラムに導入する方法である。大量試料導入は試料の注入、溶媒の除去、目的成分のカラムへの導入の3つの段階に分けることができる。最初に、PTV温度を試料溶媒の沸点近く、またはそれ以下の温度に保ち、スプリット比が大きい状態で試料を注入する。次に、PTVの温度を溶媒の沸点より20～30℃程度高い温度まで昇温する、もしくは高スプリット比を維持し続けることなどで、溶媒はスプリットベントから排出され、沸点の高い目的成分はインサート内に保持され濃縮される。最後に、スプリット比を極力小さな値に変更し、PTVを急速昇温することにより、目的成分を分析カラムへ導入する²⁾。この一連の操作によりPTVは通常の百倍以上の大量試料導入を実現でき、高感度での分析が可能になる。

以上紹介してきたように、PTVは大量試料導入による簡易的な成分濃縮ができるほか、熱に不安定な成分の分析にも適しているため、農薬分析に有効な注入法である。近年では大量試料導入だけでなく、注入口誘導体化や熱脱着・熱分解分析などに対応した多機能注入口も市販されており、手間のかかる前処理を簡便化し、幅広い用途に使用できる便利な製品として注目されている³⁾。いずれの手法も全ての試料に適用できるわけではなく、従来の前処理とのデータの相関など確認する必要があるが、分析の高感度化・前処理の簡便化に役立つツールとして、試してみたいかがだろうか。

引用文献

- 1) 芝本繁明, 和田豊仁, 水越一史, 前川吉明: 島津評論 54, 271-280 (1998).
- 2) 中川勝博, 西川 譲, 下野正男, 宮川治彦: 島津評論 53, 295-303 (1997).
- 3) <http://www.an.shimadzu.co.jp/gcms/optic.htm> (2016.04.28 閲覧)

(久保田 諒)