超臨界流体抽出とクロマトグラフィー

山内 芳雄*

Supercritical Fluid Extraction and Chromatography

Yoshio YAMAUCHI*

Utilization of supercritical fluids includes two methods; extraction (SFE) and chromatography (SFC). The most popular fluid may be carbon dioxide due to its easiness in control in the supercritical state. As a new concept of SFE using carbon dioxide, the programmed extraction elution method (PEEM) that enhances extraction efficiency and selectivity is presented, demonstrating the micro scale SFE preparation of naphthalene and anthracene.

Recently, SFC has been developed in various fields as HPLC. The author describes various applications; analysis of a surfactant using negative temperature gradient elution method, chiral prep-separation of *t*-stilbene oxide, and separation and detection of SFC-MS.

Key words : Carbon dioxide, SFE, PEEM (programmed extraction elution method), SFC, Negative temperature gradient elution, SFC chiral separation, SFC-MS.

1. 超臨界流体について

超臨界流体とは、図1に示すように、臨界温度と臨界圧力を越えた領域にある流体で、その言葉から受けるような、いかなる物質をも思いどおりに溶かす万能の流体ではない。

Fig. 1 Temperature-pressure phase diagram.
TP : triple point CP : critical point

* 日本分光(株)第二技術部 ()

* JASCO Corporation, Liquid Chromatography Division.
()

物質には、臨界温度(T_c)と臨界圧力(P_c)があり、臨界温度以上では、いくら加温しても、気体にはならない。また臨界圧力以上では、いくら加圧しても液体および固体にはならない。この状態にある流体を一般に超臨界流体と呼ぶ。この状態は圧力と温度を変化させることにより液体とほぼ同等の密度を得ることができ、気体に比較し、物質をよく溶かすことが知られている。

1.1. 超臨界流体の物性

超臨界流体は一般の気体、液体には見られない性質を持っている。表1は、気体、液体、超臨界流体の密度、拡散係数、粘性について比較したものであるが、超臨界流体の密度は、気体の数100倍で、液体に近い値であるが、粘性は気体と同等である。また、拡散係数は気体の100分1程度であるが、液体に比べ数100倍大きい。これは超臨界流体の物質移動および固体の3次元マトリックス中への浸透が液体よりも速いことを示す。したがって、超臨界流体を抽出溶媒、あるいは移動相溶媒として用いた場合、液体を用いる場合より高速での操作が可能である。さらに、臨界点(CP)付近においては、密度が温度、圧力により大きく変化することから、温度および圧力を変化させることによって溶解度を数100~1000倍という大きな幅で変えることができ、単一溶媒系では得られない溶媒強度差を得ることができる。抽出においては、流体からの抽出物の分離を容易にし、また、クロマトグラフィーにおいては、圧力または温度プログラミン

Table 1 Physical properties of gas, liquid and supercritical fluid.

	Units	Gas	Liquid	Supercritical Fluid
Density	g/cm ³	0.6-2x10 ⁻³	0.6-1.6	0.2-0.9
Diffusivity	cm ² /s	1-4x10 ⁻¹	0.2-2x10 ⁻⁵	0.5-1x10 ⁻³
Viscosity	g/cm·s	1-3x10 ⁻⁴	0.2-3x10 ⁻²	1-9x10 ⁻⁴

Table 2 Critical temperatures and pressures of various fluids.

	Critical temperature (°C)	Critical pressure (atm)
NH ₃	132.3	112.0
CO ₂	31.1	72.9
N ₂ O	36.5	71.9
Xe	16.6	57.7
C ₃ H ₈	123.7	42.0
C ₆ H ₁₄	230.9	31.3
C ₈ H ₆	288.9	48.3
H ₂ O	374	218

グが液体クロマトグフィーにおける勾配溶出(グラジェント)法と同じ効果をあげることができる。

表2に種々の物質の臨界温度と臨界圧力を示す。最もよく使用されている流体は二酸化炭素であり、溶媒に例えるとヘキサンがこれに相当する。密度を上げることによりジクロロメタンぐらいの溶媒強度まで制御できる。

他の流体の超臨界状態では、可燃性流体を扱う場合ほとんどが発火点以上の温度となるため、漏れには十分注意する必要がある。

2. 超臨界流体抽出 (SFE) について

図2にSFE装置の流路を示す。構成は、ポンプ、温度制御可能な抽出容器、圧力調整弁および分画容器から構成される。この装置の操作は、試料を容器に入れ、ポ

Fig. 2 A schematic diagram of the typical SFE system. 1=pump, 2=extraction vessel, 3=back pressure regulator, 4=collection vessel

ンプにより流体を送液する。圧力調整弁の設定圧力になるまで加圧され、さらに設定圧力になると循環送液され、試料の可溶部分が抽出され、これが圧力制御弁を通過すると密度が下がり、抽出物が分画容器に析出する。流体はまた低密度の状態でもポンプに送り込まれる。このように抽出が連続的に行われる。プラントでは、数1000から数100l、実験機では数10lでのスケールで行われているが、数10mlでのマイクロスケールの実験機も市販されている。

SFEでは、溶媒抽出とよく比較され、二酸化炭素を使用した場合のSFEの利点は、試料に流体が残留しない、無害である、および酸素と接触しないため酸化が起こらないことにある。また、欠点としては、装置が高価であることがあげられる。抽出操作における選択性は密度をコントロールして行い、ヘキサン以下からジクロロメタン程度の溶解度まで温度および圧力を変えコントロールできる。これ以上の溶解度および極性で使いたい場合は補助溶媒としてアルコールなどを添加し、極性を高める方法がある。二酸化炭素を使用し脂肪酸、脂溶性ビタミンなどの脂質への応用が多い。

2.1. PEEM について¹⁾

二酸化炭素を使用したSFEでの抽出の選択性は、前記のとおりであり、その程度の選択性は得られるが、例えば、炭素数および多少の極性の差等での分画は非常に

Fig. 3 Extraction profile of PEEM using naphthalene and anthracene.
Extraction conditions: fluid=CO₂, flow rate=5.0 ml/min, stationary phase size=10 mm ID×100 mmI, temperature=60°C, pressure=10 MPa for 0 to 30 min, 25 MPa for 30 to 120 min, sample charge amount=100 mg of naphthalene and anthracene

困難である。ここでは、固定相を使用した新しいコンセプトの抽出法を紹介する。これは、固定相と試料の相互作用の有無を使用し、無い試料は固定相を通過させあるものと分画する。また相互作用がある試料は固定相に可能な限り吸着させ、そこから密度を制御しながら抽出を始め、分画を行う。ここではナフタレンとアントラセンの抽出分画を例に説明する。流体には二酸化炭素を、固定相にはシリカゲルを粗に充填したものを使用した。試料導入に抽出容器を使用し、この中に粉末のまま試料をいれ、二酸化炭素を導入した。このときの抽出プロファイルを図3に示す。初期圧力は10 MPaで制御した。この状態では試料はともに可溶な状態であり、固定相が無い場合はともに抽出されるが、アントラセンのみ固定相に吸着されナフタレンが圧力制御弁から回収できた。さらに、25 MPaでの操作により固定相からアントラセンを回収した。このように、固定相を抽出に使用した場合、選択性の飛躍的な向上が可能であった。

そのほかの応用例は、レモンコールドプレスオイルの極性の差に基づく分離(炭化水素と含酸素化合物)²⁾、および魚油中のEPA、およびDHAの分画³⁾などがある。

3. 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) について

SFCは大きな2つの流れがあり、1つはパックドカラムSFC⁴⁾とキャピラリーカラムSFC⁵⁾である。後者は、ガスクロマトグラフィー(GLC)の中空キャピラリーカラムのような高理論段数が得られず、現在ではほとんど使用されていない。

パックドカラムSFCでは、様々なカラム径のものが使用されている。分析においては0.3~4.6 mm、分取においては20 mm程度までのカラム径が使用されている。また検出器においては、紫外可視多波長検出器を始めとして、光散乱検出器、FID、IR、MSなどの直結が容易に可能であるものが市販され、分析およびセミ分取スケールでの装置としては確立されてきている。

図4にSFCの流路図を示す。装置の構成はHPLCに

Fig. 4 A schematic diagram of the typical SFC system.
1=fluid, 2=pump, 3=pressure gage, 4=heat exchanger, 5=injector, 6=column, 7=detector, 8=back pressure regulator, 9=flow meter

よく類似し、GLCおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)との違いはカラムの後に装置全体の圧力を制御する手段の有無にある。超臨界状態を維持するために必ずこれが必要となる。溶出挙動は高温領域ではGLCにまた低温ではHPLCに似ているが、これら2つの混合的挙動である。

Fig. 5 SFC chromatogram of TRITON X-100 using negative temperature gradient elution. Conditions; column=C 18 silica gel, eluent= CO_2/EtOH (3.0/0.2 ml/min), pressure=20 MPa, column temperature=initial temperature 120°C rate $-3^\circ\text{C}/\text{min}$

3.1. 降温グラジエント分析(界面活性剤への応用)

SFCにおいて、圧力を一定の条件で、低温から温度を上昇させクロマトグラムの保持時間を測定すると、保持が最大となる温度が必ず存在する。この理由は、その温度から下は密度の上昇があり、溶出強度が増加するためである。また、それ以上の温度ではGLCの影響で保持時間が短くなる。ここでは、温度を下げ密度を上げる、すなわち降温グラジエント法を紹介する。図5にこの代表的なクロマトグラムを示す。試料として Triton X-100 を用いた。これは逆相 HPLC では分離が非常に困難であるが、降温分析では各成分の異性体を含め 15 分以内に分析できた。また、他の応用として、p-MMA のオリゴマー分離分取では内系 10 mm のカラムを使用し 100 量体までのオリゴマーが分取でき、各フラクションの NMR の測定など構造解析に用いている⁶⁾。

3.2. 光学異性体の分離分取

SFC の利点の 1 つとして、光学異性体の分離があげられる。HPLC との分離度の比較では、SFC が優れている試料が多く⁷⁾、また、温度を下げサブクリティカル領域と比較すると非常に大きな分離度が得られる。光学分割における SFC のもう 1 つの利点として分取した後溶媒除去の手間がかなり省けることにある。また、溶離液に起因する有害物質のコンタミネーションが無く、製薬の精製には好都合である。ここでは α -スチルベンオキシドを試料とし、これの光学分割を連続注入および自動分取した例を示す。図6にそれを行ったときの流路

Fig. 6 SFC diagram of automated preparative system for chiral separation. PU 1= CO_2 pump, PU 2=modifier pump, PU 3=sampling pump, RF=release valve, PC=heat exchanger, SV=switching valve, EV/SC=extraction vessel or column, BR=back pressure regulator, UV=UV detector, CV=collection vessel

Fig. 7 Repetitive preparative chiral separation of *t*-stilbene oxide.

Conditions ; column=Dicel Chiral cel AD 20 mmI D×200 mmI, flow rate=EtOH (10.0/1.0 ml/min), pressure=20 MPa, sample injection amount=200 mg/1 injection

図を示す。試料注入には高圧ポンプを使用し、試料をカラムに導入した。+および-に分割された試料は、圧力制御弁を通じ、2つの高圧バルブに導かれる。上流側のバルブは、分取か廃棄流路の選択を行い、また下流側のバルブは+または-成分のフラクショネーションを行う。図7に自動連続分割を行ったSFCクロマトグラムを示す。およそ2時間で2gの試料が処理でき、この時の純度は99%以上であり、95%以上回収できた。数グラムオーダーの分割には十分使用でき、具体的な応用が期待される。

3.3. SFC-MSへの応用

最後にオンラインSFC/MSを紹介する。この方法は、流路を高圧側でスプリッターにより分岐し、試料の一部をMSに導入する方法である。この方法で石油、医薬関連物質について実験を行い良好な結果が得られた。ここでは一例として、光学異性体の分離検出を示す。試料にはフラバノンを使用した。図8にUVとMS検出器を使用し得られたクロマトグラムと+および-体のマススペクトルを示す。

4. おわりに

ここで紹介したシステム、手法、および分析例はごく一部であるが、SFEおよびSFCは種々の分野で応用可能であり、他にない有用性がある。抽出においては多成

分系の超臨界流体抽出が必要な分野で、抽出プロセスおよび抽出成分の研究、あるいは既存設備のモニタとして威力を発揮することが期待される。また、SFCにおいては、守備範囲は多少狭い感はあるが、GCやHPLCでの分析の欠点を補い、有効に使用できる可能性がある。

(平成8年2月7日受理)

文 献

- 1) Y. Yamauchi, M. Kuwajima, M. Saito, *J. Chromatogr.*, **515**, 285 (1990)
- 2) Y. Yamauchi, M. Saito, *J. Chromatogr.*, **505**, 237 (1990)
- 3) S. Higashidate, Y. Yamauchi, M. Saito, *J. Chromatogr.*, **515**, 295 (1990)
- 4) E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner, *J. Org. Chem.*, **27**, 700 (1962)
- 5) M. Novotny, S.R. Springton, P.A. Peaden, J.C. Fjeldsted, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, **54**, 1883 (1982)
- 6) K. Ute, N. Miyatake, T. Asada, K. Hatada, *Polym. Bull.*, **28**, 561 (1992)
- 7) S. Hara, A. Dobashi, K. Kinoshita, T. Hondo, M. Saito, M. Senda, *J. Chromatogr.*, **371**, 153 (1986)

Fig. 8 SFC-MS detection of flavanone.

Conditions ; column=Dicel Chiral cel OD 4, 6 mmID×250 mm, flow rate=CO₂/EtOH (2.0/0.2 ml/min), back pressure=20 MPa, A=SIM detection (Mw=225.1), B=TIC detection, C=UV-250 nm detection, D and E=MS spectra of each peak