

超臨界流体法と液体法をインラインで一体化した ユニファイドクロマトグラフィー

研究者：馬場 健史 九州大学 生体防御医学研究所 主幹教授
開発企業：山本 靖則 株式会社 島津製作所 代表取締役社長
(推薦者：大川 恭行 九州大学 生体防御医学研究所 所長)



馬場 健史 氏



山本 靖則 氏

1. 技術の背景

近年、食の安全確保や病気の早期診断などでより早く、より正確に分析結果を得ることが求められている。しかし、食品や血液が分析対象となるこれらの分析は煩雑な前処理が不可欠であり、また、空気に触れただけで酸化や分解してしまう成分もあるため、正確な分析が困難であった。これらの問題を解決する手段として、気体と液体の両方の性質を持つ「超臨界流体」を用いて、幅広い性質を持つ多成分の一斉分析を煩雑な前処理なく全自動かつ高速分析できる分析システムが期待されていた。

これまで分取、精製の限られた分野で利用されてきた超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)は疎水性化合物の分析には有用であったが、親水性化合物の分離には適さず、また質量分析計に接続可能な分析スケールの装置がなかったために限られた分野での利用にとどまっていた。

一方で、サンプルの前処理を行う超臨界流体抽出(SFE)に関しては、多検体を自動処理できるSFE装置が市販されておらず、その結果SFEとSFCを接続することでサンプルの前処理から分析まで自動で実行できるシステムも研究段階にとどまっていた。

2. 技術の概要

超臨界流体とは、臨界点（各物質が固有に持つ温度・圧力の点で、臨界点以上では液体と気体の共存状態がなくなる状態に変化する）を超えた状態の流体で、気体の低粘性、高拡散性と、液体の高溶解性という両方の性質を併せ持つ。分析では主に二酸化炭素が用いられ、臨界温度 31.1℃以上、臨界圧力 7.38 MPa 以上と、比較的簡単な条件で超臨界流体にすることが可能である。毒性もほとんどなく、化学的に安定であり、高純度なものが安価に入手できるという理由から最も多く利用されている（表 1、図 1）。

SFCは、通常のカクロマトグラフィー(GC)では分析が困難な難揮発性、熱的不安定成分の分析が可能で、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と比較して分離を損なわずに分析の高速化が図れることから、さまざまな分析系の開発やそれらを用いたアプリケーションが研究されてきた。しかしながら、二酸化炭素はヘキサンと同程度の低極性溶媒であるため、親水性化合物の分析にはモディファイアと呼ばれるメタノールなどの有機溶媒を添加する手法が用いられているが、その場合でも適用には限界があった。馬場らのグループはSFCを用いた親水性化合物への適用技術の開発に取り組み、通常30%程度のモディファイアを用いる移動相条件であるが、100%までのグラジエントを用いた分析条件により、脂溶性と親水性のビタミンの一斉分析に成功した。その成果を基盤として、SFCとHPLCを融合した新たな拡張分離モードである「ユニファイドクロマトグラフィー(UC)」を世界に先駆けて提唱し、質量分析計との接続が可能なUC装置を製品化し、適用範囲を代謝物の包括的な解析を目的とするメタボローム解析などへも拡張した。さらに、インラインで超臨界流体抽出(SFE)後、連続して超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)により分離・分析を行う新たなシステムも開発し、SFCの利用拡大、有用な知見を提供することができた。

表 1 状態による各パラメータの比較

	拡散係数 (cm^2/s)	密度 g/cm^3	粘度 $\text{g}/\text{cm} \cdot \text{s}$
液体	10^{-6}	1	10^{-2}
超臨界流体	10^{-3}	0.2~0.8	10^{-3}
気体	10^{-1}	10^{-3}	10^{-4}

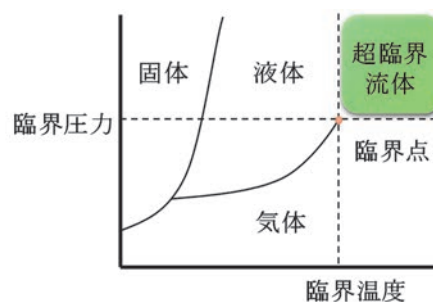


図 1 物質の状態図

以下に製品化された装置の写真を示す（図2）。



図 2 島津製作所 SFE-SFC Nexera UC システム

SFC システムを構築する上で最も重要なユニットは自動背圧制御装置となる。SFC を実施するうえで二酸化炭素の気化を防ぐために出口部分に 10 MPa 程度の圧力を付与する必要があるが、この圧力が変動すると分析の再現性及びベースラインの変動に影響を及ぼし、また、内部容量が大きい場合、後段に接続する質量分析計でのピークの広がりをもたらす。そこで、我々はこれまでにない低デッドボリュームで高精度の圧力制御が可能な新規自動圧力制御装置（ABPR）を開発した。以下にその制御機構を示す（図3）。

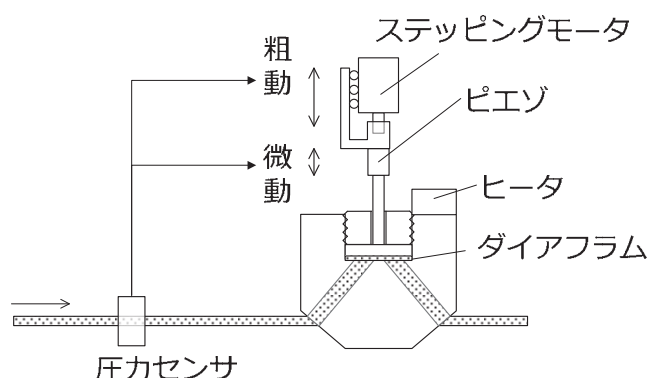


図 3 自動背圧制御装置の制御機構

本 ABPR を用いることで圧力変動を ± 0.01 MPa に抑えることが可能となり、質量分析計に接続可能なユニファイドクロマトグラフシステムの構築を実現した。

3. 効果

本システムを使用することで、従来は疎水性化合物に限定されていた SFC の適用範囲を親水性化合物まで広げ、多種多様な化合物の包括的な解析を可能にした。これにより、脂溶性および親水性ビタミンの一斉分析が可能となり、一度の分析で幅広い極性の化合物を扱うことができるシステムの構築ができた（図 4）。

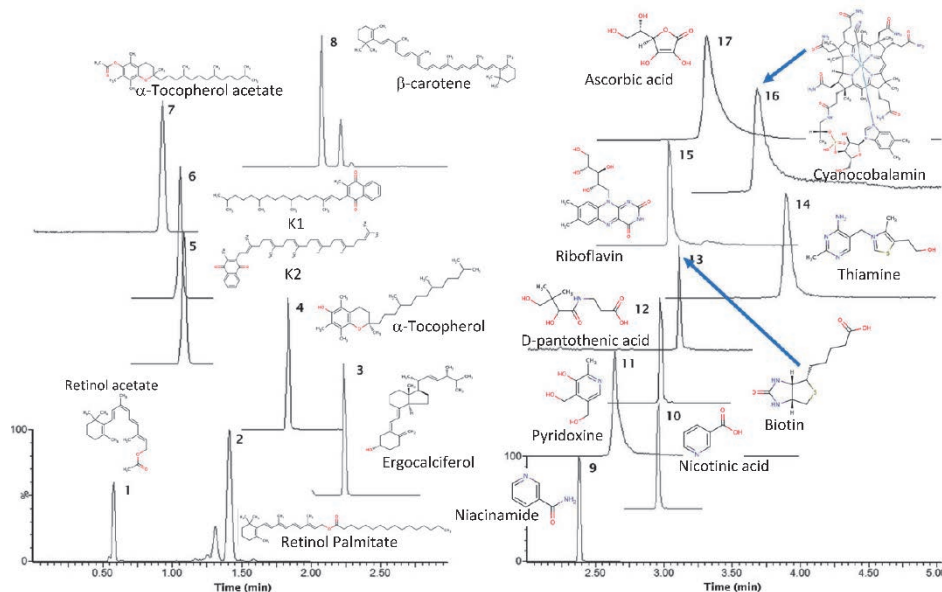


図 4 脂溶性、親水性ビタミンの一斉分析

また、SFE-SFC システムを用いることにより、これまで手作業で前処理を実施していた工程を自動化することが可能となり、固体試料から目的成分を抽出し SFC 分析にインラインで導入することで、前処理を不要とした新しい分析スタイルを実現した。トマトペーストの場合、わずか 5 分の事前操作の後、リコペンの抽出、分離、検出の一連の工程を自動で実施可能となった（図 5）。

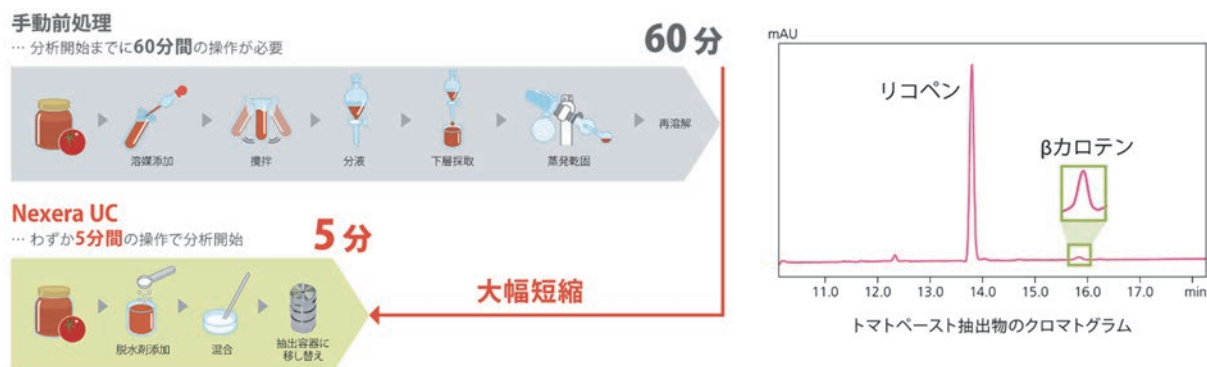


図 5 SFE-SFC を用いたトマトペーストに含まれる成分の分析例