

2022年超臨界流体部会基礎セミナー

超臨界CO₂クロマトグラフィー

2022年11月28日
オンライン

九州大学生体防御医学研究所
附属高深度オミクスサイエンスセンター
質量分析センター・メタボロミクス分野
馬場 健史

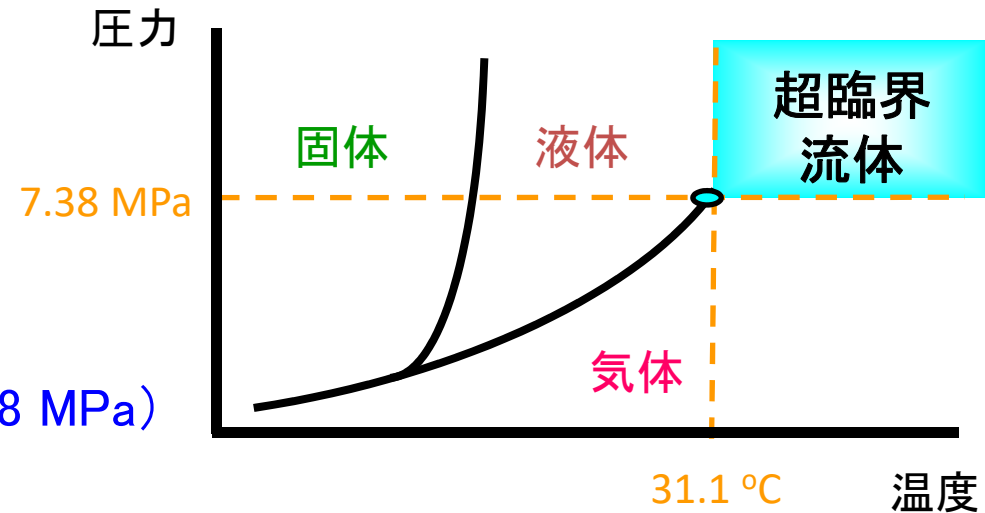
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)

超臨界二酸化炭素の特徴

- ・高拡散性, 低粘性
- ・不燃性, 安価, 無毒性
- ・非極性
- ・取り扱いの簡便さ

(臨界温度 31.1°C, 臨界圧力 7.38 MPa)



二酸化炭素の状態図

SFCの特徴

- ・高速分析が可能
 - ・高分離
- **ハイスループット**
イニシャライゼーションも短時間
- ・疎水性化合物の分析に有用 ← **CO₂は低極性**
 - ・添加剤(モディファイヤー)を加えることにより極性を大きく変化させられる
→ 幅広い化合物の分離に対応

SFCの特徴

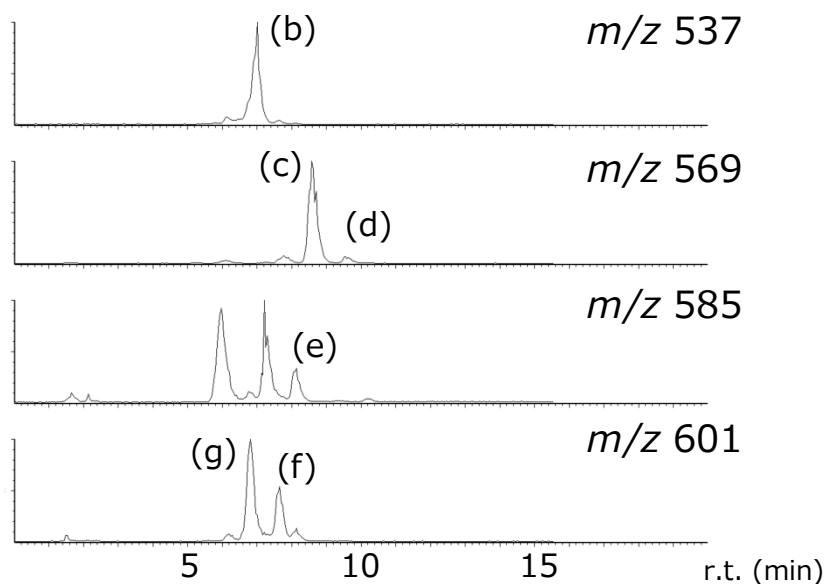
- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能)
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- 高分子成分への対応
- 分取への拡張性

SFCの特徴

- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能)
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- 高分子成分への対応
- 分取への拡張性

SFC-QMS によるカロテノイド類の高分離分析 (カラム長延長)

Sample : *Chlamydomonas reinhardtii* (緑藻)のアセトン抽出物

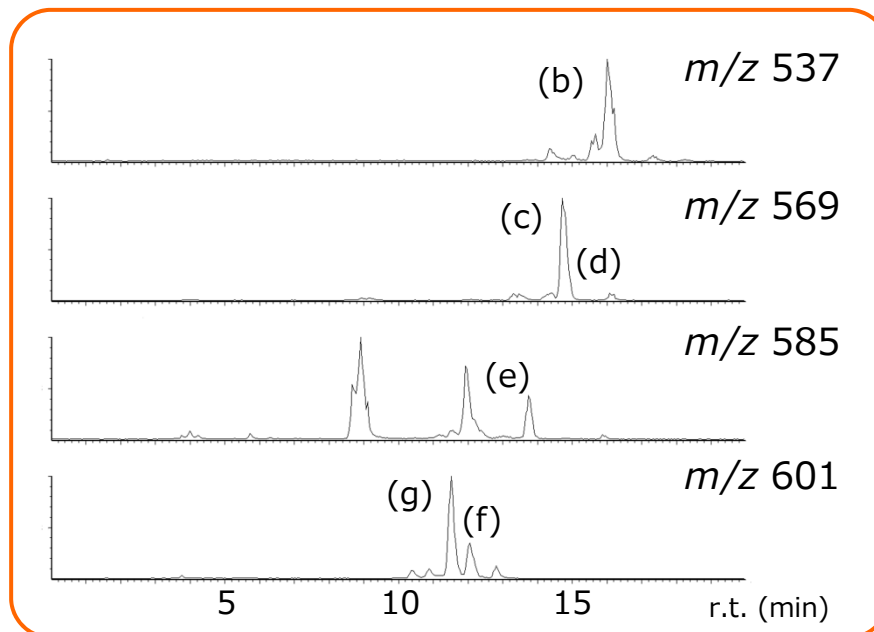


モノリスシリカカラム

Chromolith Performance RP-18e

4.6 mm X 100 mm (Merck)

modifier 1-7% (12 min)



分離の向上

モノリスシリカカラム

Chromolith Performance RP-18e

4.6 mm X 100 mm X 3 (Merck)

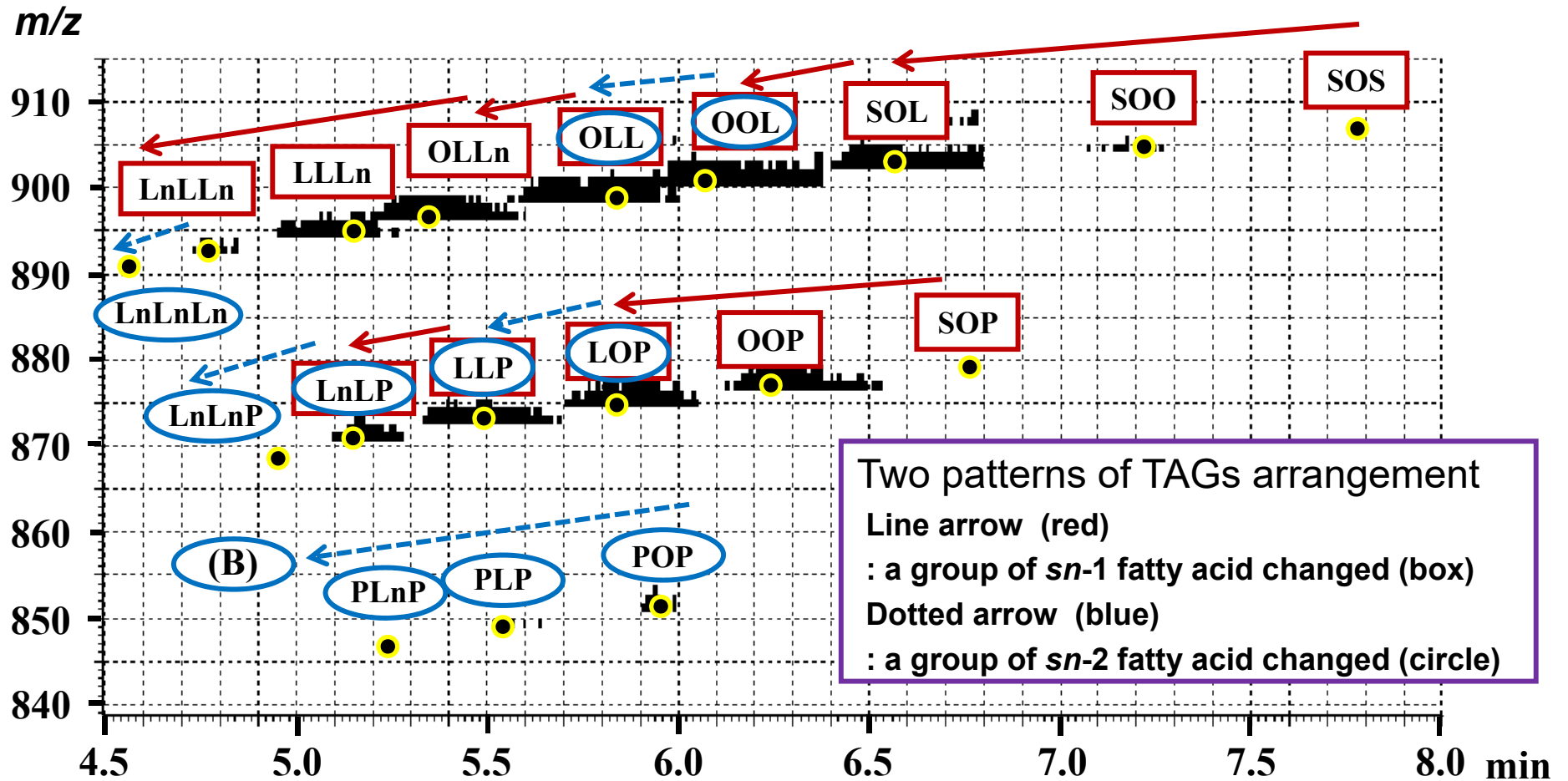
modifier 1-11% (20 min)

(a) lycopene, (b) β -carotene, (c) lutein, (d) zeaxanthin, (e) antheraxanthin, (f) neoxanthin, (g) violaxanthin 5

Matsubara, A. *et al.*, *J. Sep. Sci.*, **32**, 1459 (2009)

SFC-QMS を用いたダイズ TAG プロファイリング

Small circle (o) : peak top of each TAG

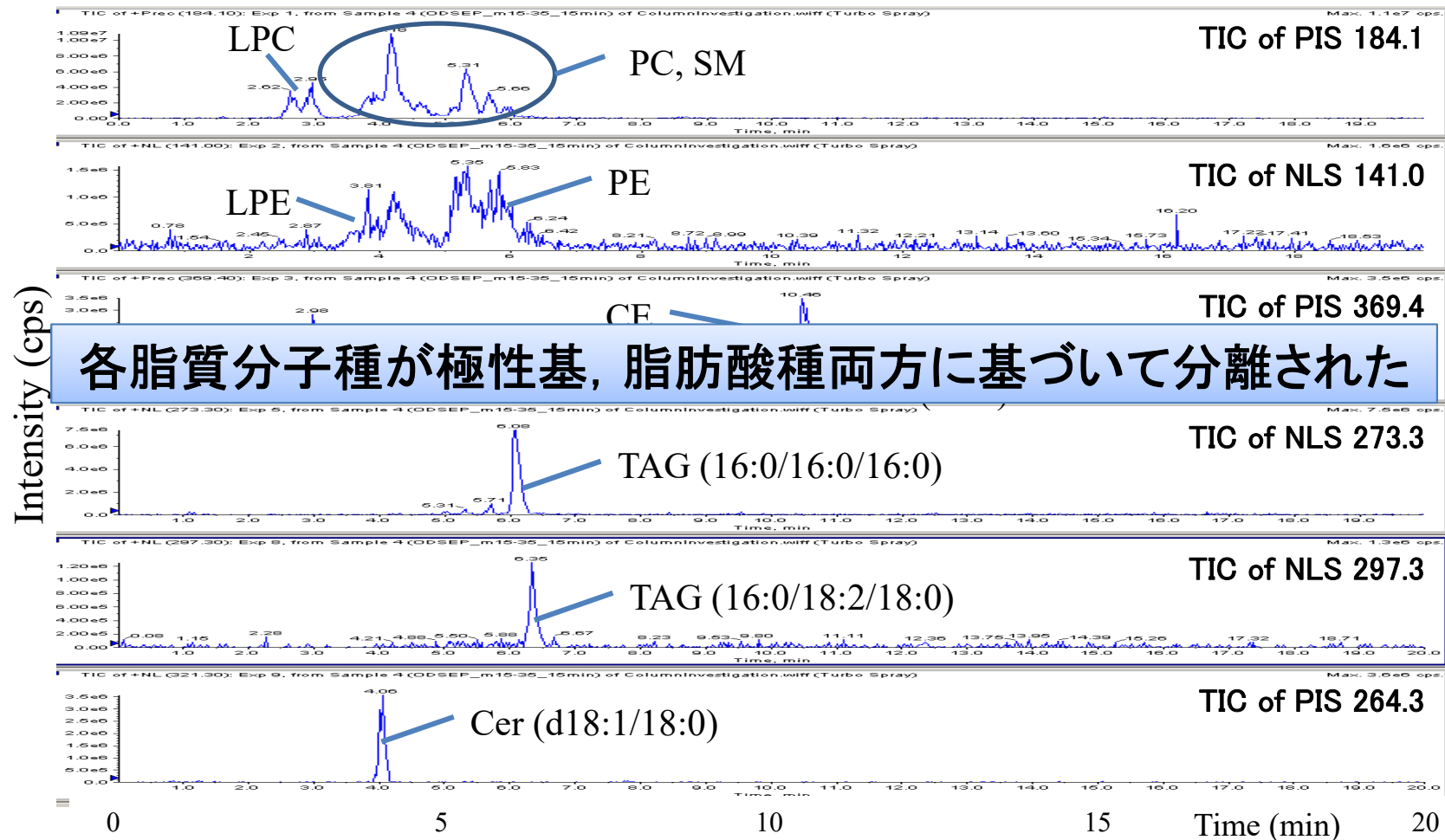
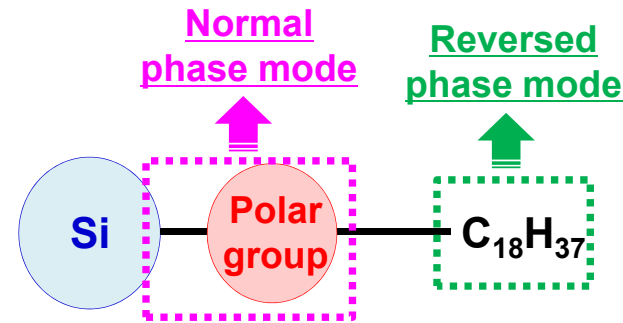


SFCの特徴

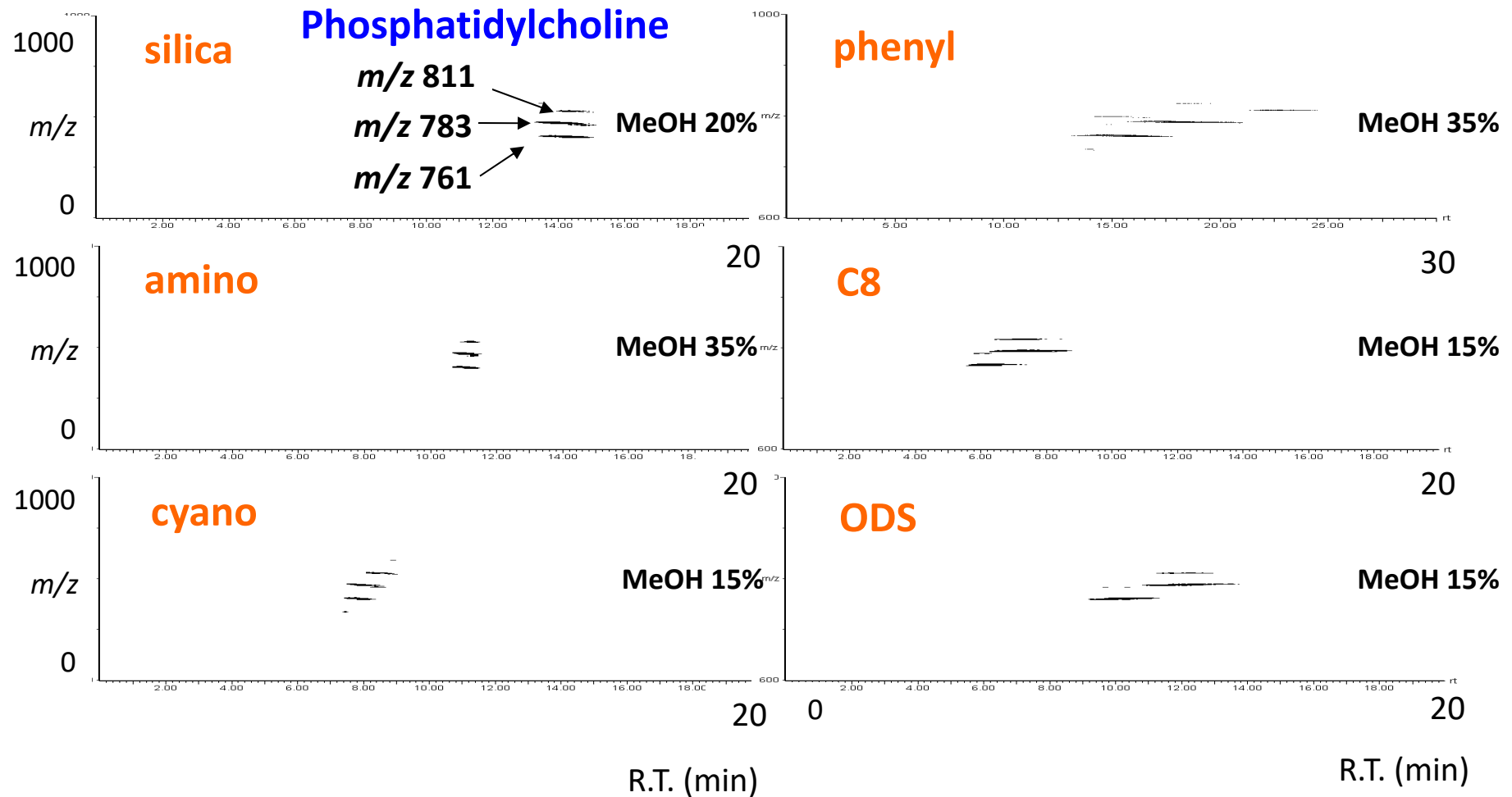
- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- **他にない分離モード(順相+逆相)**
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能)
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- 高分子成分への対応
- 分取への拡張性

脂質分析におけるSFCの分離特性

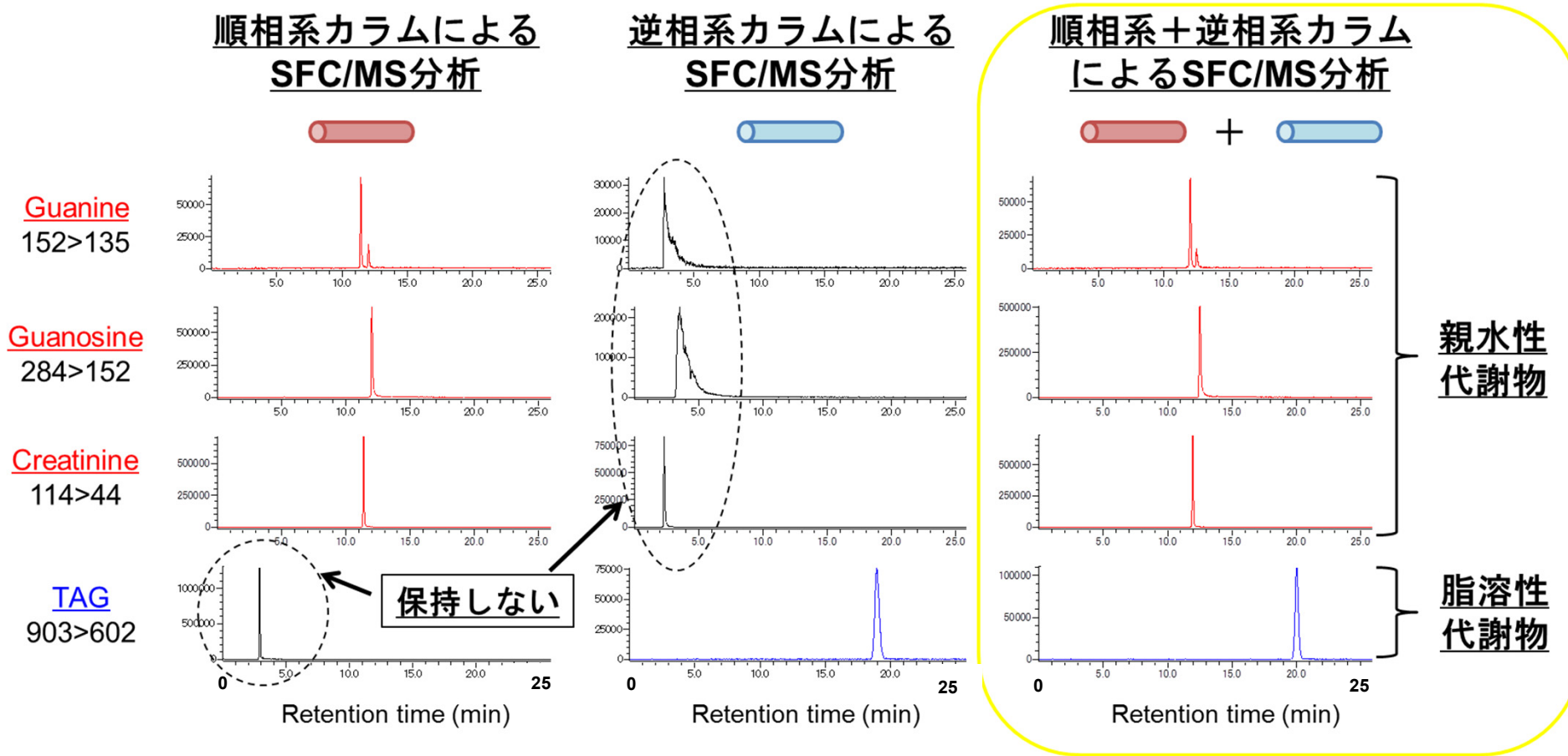
Inertsil ODS-EP column
(GL Science, 4.6 x 250 mm i.d., 5 μm)



Phosphatidylcholine 混合物のSFC/MS 分析における各種カラムの分離特性



順相・逆相タンデムカラムSFC/MSシステムの開発



カラム長2倍 ✕ 圧力2倍 ✕ 分析時間2倍
 SFCの潜在特性により1台の分析プラットフォーム
 で包括的代謝分析が実施可能

SFCにおける固定相のキャラクタリゼーション

Journal of Chromatography A 1639 (2021) 461923



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



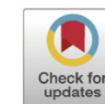
Characterization of stationary phases in supercritical fluid chromatography including exploration of shape selectivity

Quentin Gros^{a,b}, Jeremy Molineau^a, Angeline Noireau^a, Johanna Duval^b, Takeshi Bamba^c,
Eric Lesellier^a, Caroline West^{a,1,*}

^a University of Orleans, ICOA, CNRS UMR 7311; Pôle de chimie rue de Chartres - BP 6759 45067, Orléans Cedex 2, France

^b Shimadzu France, Le lizzard 2, Bat A, Bd Salvador Allende Noisiel, 77448 Marne-la-Vallée, France

^c Kyushu University, Division of Metabolomics, Medical Institute of Bioregulation, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan



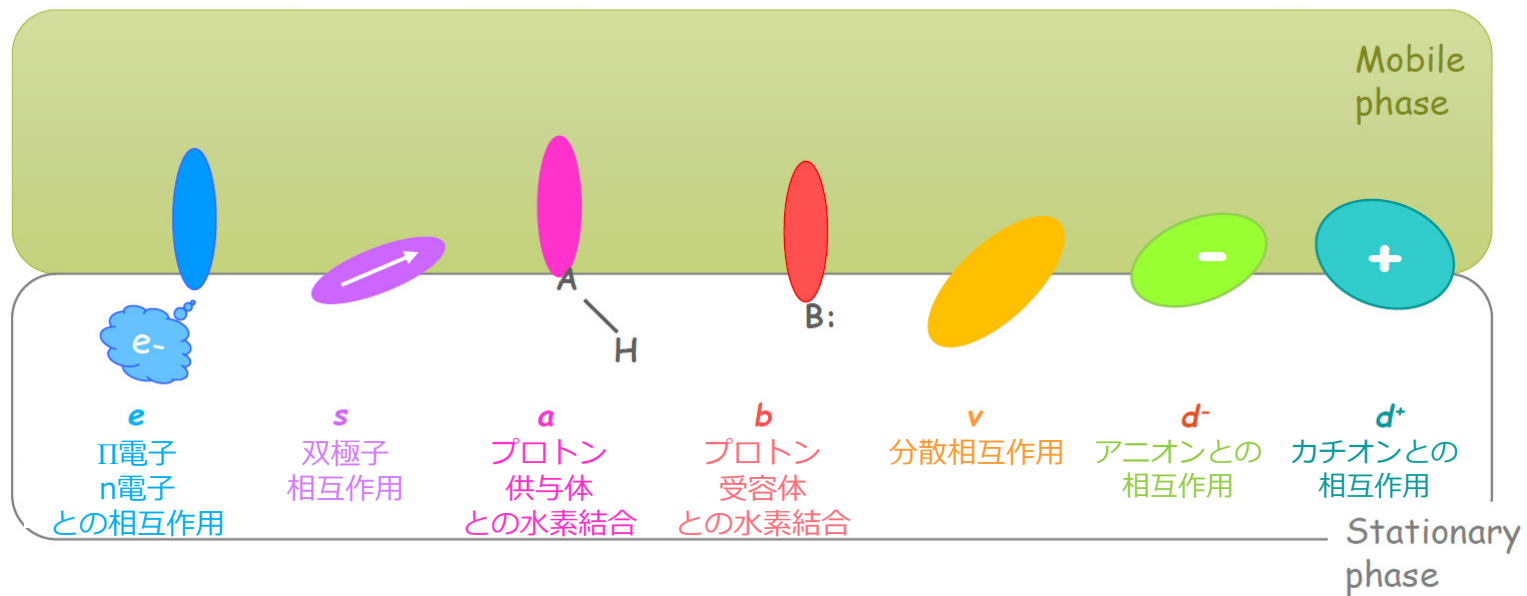
SFCにおける固定相のキャラクタリゼーション

オルレアン大学ウエスト教授のチーム

SFCの保持に関連する要因は7個

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + d^-D^- + d^+D^+$$

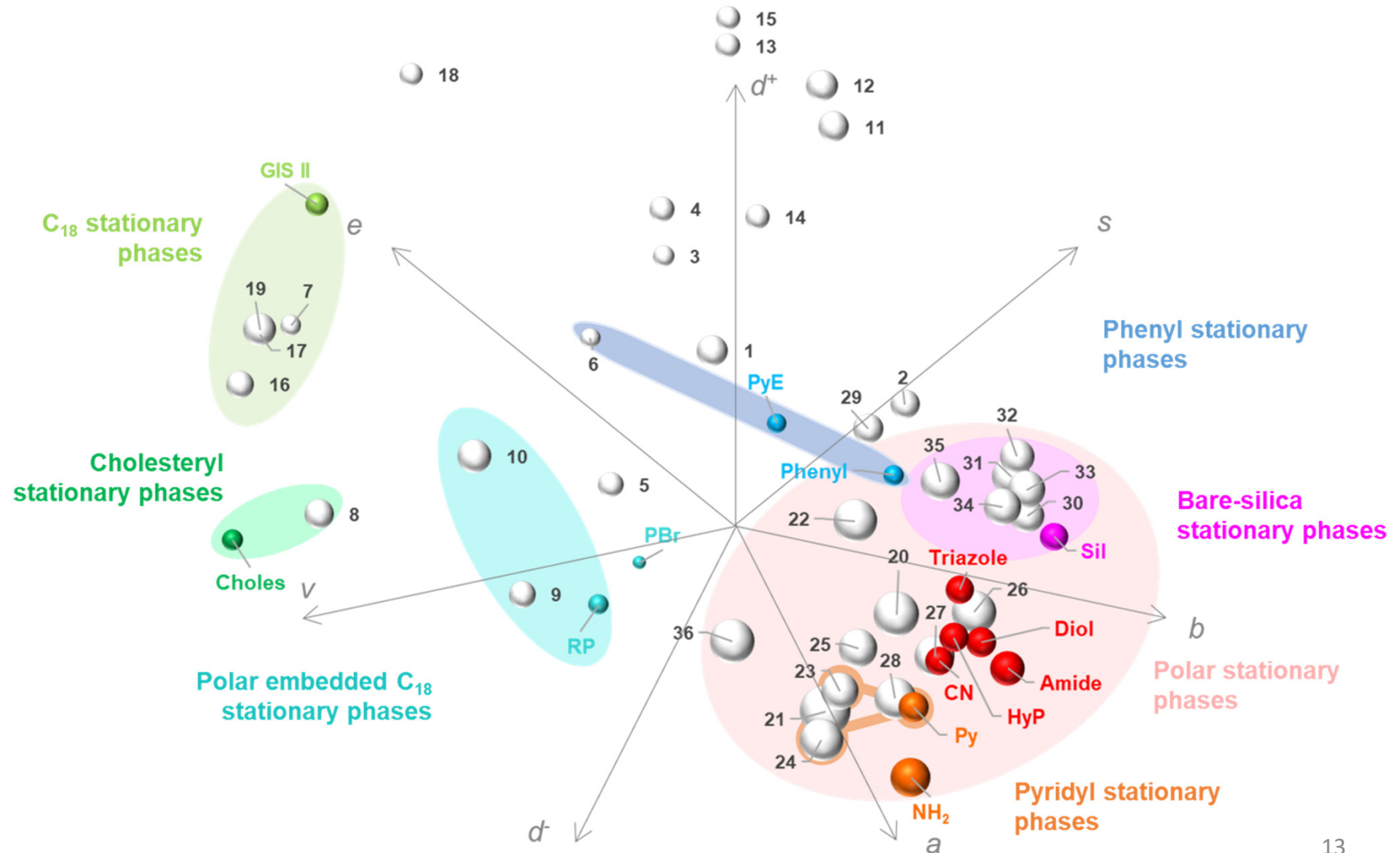
E S A B V D^- D^+
π電子 双極子 プロトン プロトン 分子体積 負電荷 陽電荷
n電子 相互作用 供与体 受容体 分散相互作用 アニオンとの カチオンとの
との相互作用 との水素結合 との水素結合 相互作用 相互作用



この要素をShim-packに適用し分類を試みる

SFCにおける固定相のキャラクタリゼーション

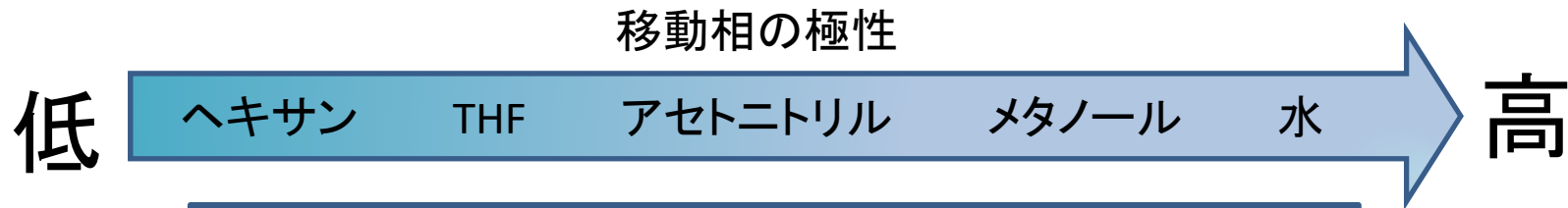
7要因で分類したスパイダーグラム



SFCの特徴

- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- **網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能)**
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- 高分子成分のへの対応
- 分取への拡張性

SFCの適用範囲の拡大へのトライ



クロマトグラフィーは移動相の極性で分離できる化合物が決まる

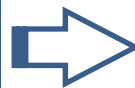
- ✓ 極性が低い場合: 脂質など疎水性化合物に好適
- ✓ 極性が高い場合: 酸など親水性化合物に好適



疎水性から親水性までの化合物を一斉分析するには？

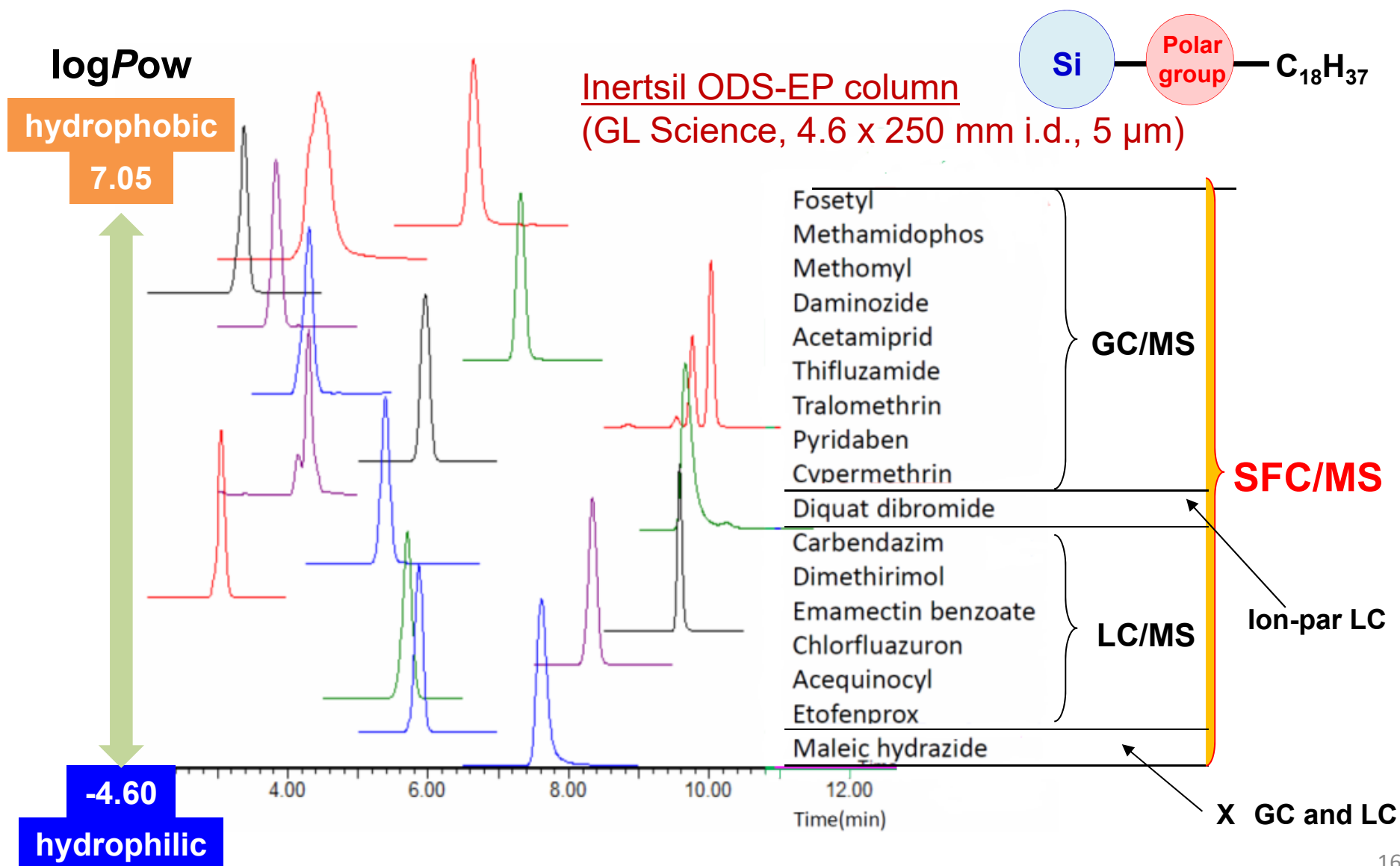
移動相の極性を大きく変化させる

移動相の可変幅
GC < LC < SFC

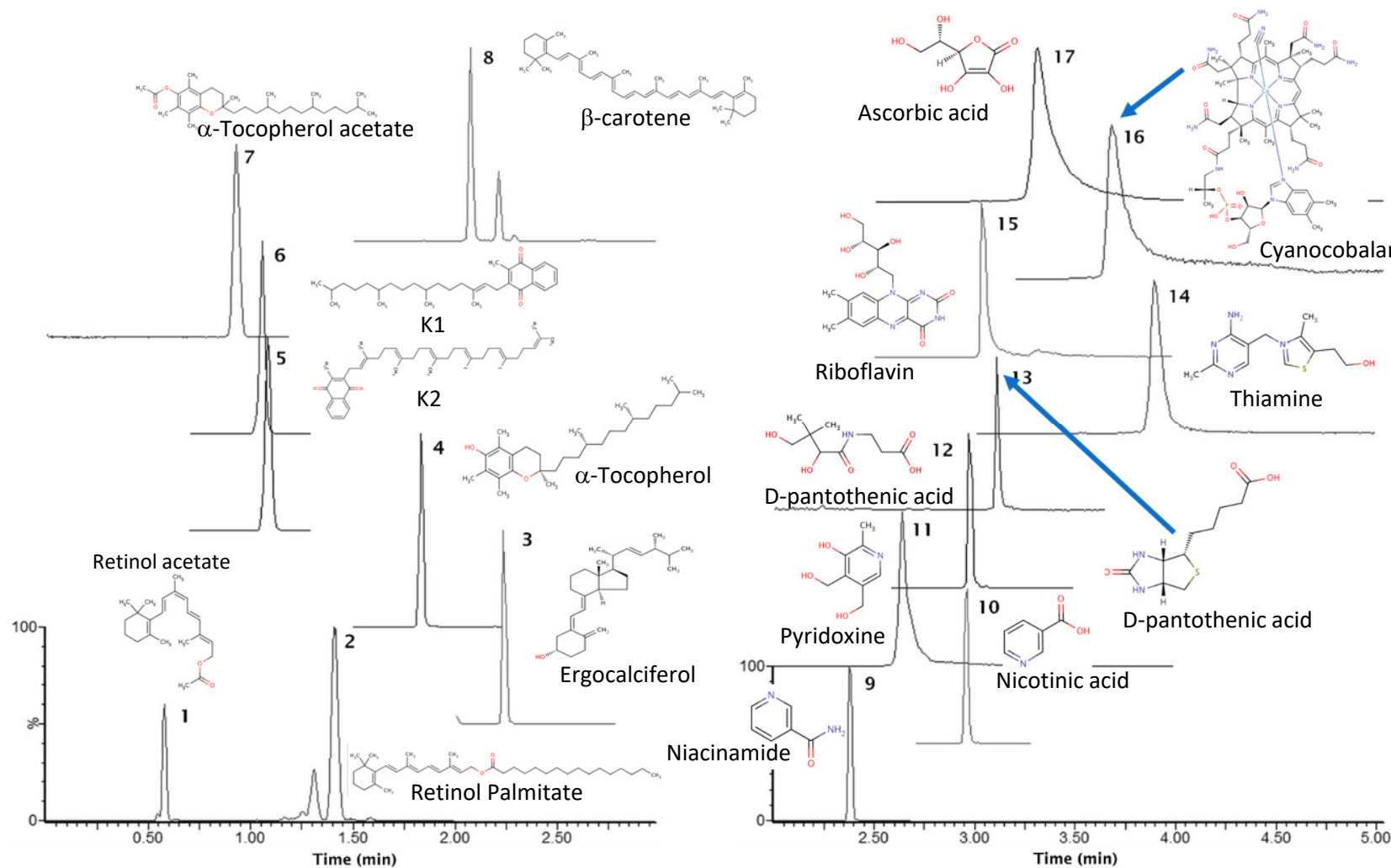


SFCは最も幅広い分析種に
対応可能な分離技術

SFC-QqQMS を用いた農薬成分の一斉分析



Unified Chromatographyによる脂溶性および水溶性ビタミンの一斉分析



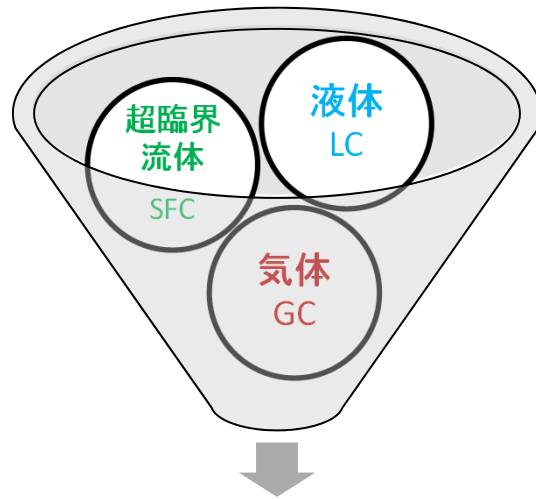
Peak #	Log P
1	6.56
2	10.12
3	7.59
4	8.84
5	9.01
6	8.48
7	9.19
8	9.72
9	-0.45
10	0.29
11	-0.57
12	-1.12
13	0.17
14	-2.11
15	-1.05
16	0.67
17	-1.58

Modifier: MeOH+5%H₂O, 2-100% (8.5min)

Taguchi, K. et al., *J. Chromatogra. A*, 1362, 270 (2014)

Unified Chromatography (UC)

現在の分離技術: 移動相の物理状態で分類



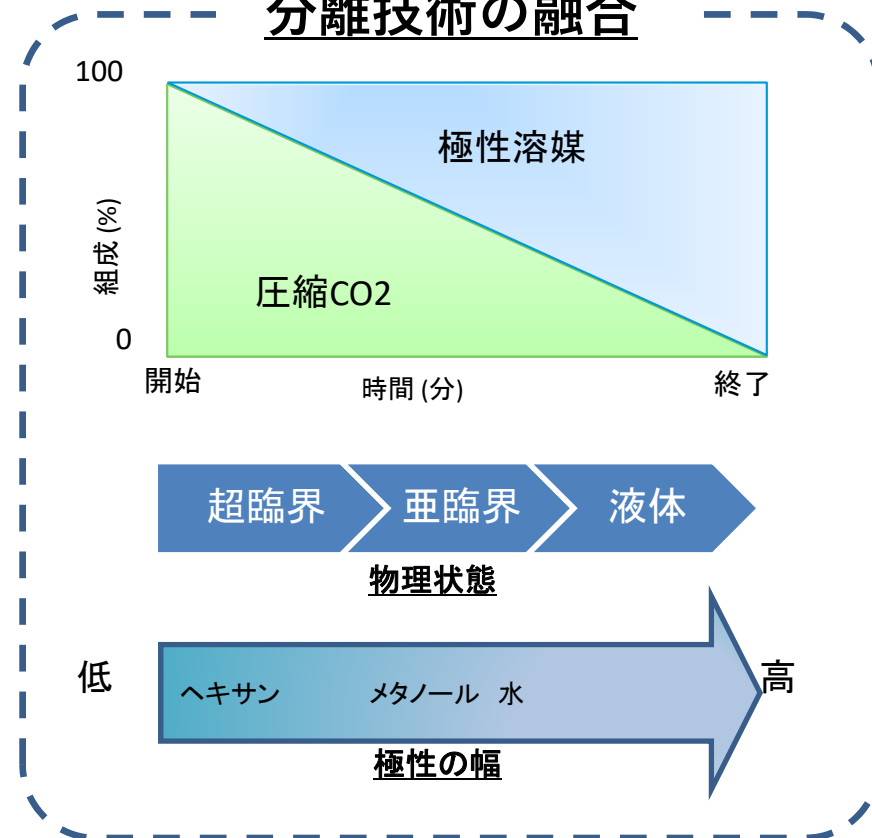
Unified chromatography

移動相の物理状態を複数利用、
極性範囲の制限を失くし
幅広い化合物を網羅的に分析

圧縮CO₂を移動相に使用

- ❑ 移動相は超臨界・亜臨界・液体の3態を経る
- ❑ 圧縮CO₂にメタノールや水を混合
- ❑ 組成比で移動相物理状態を制御

分離技術の融合

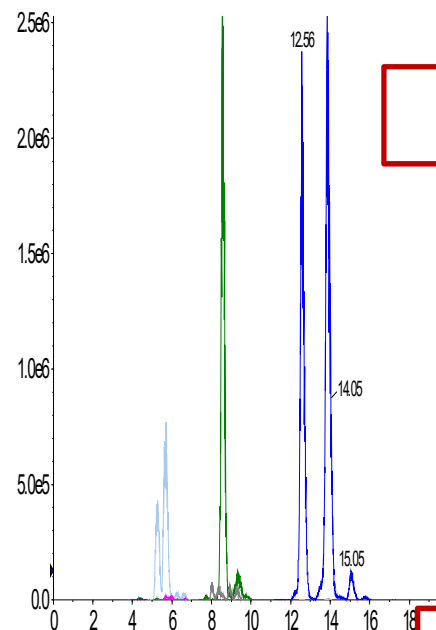
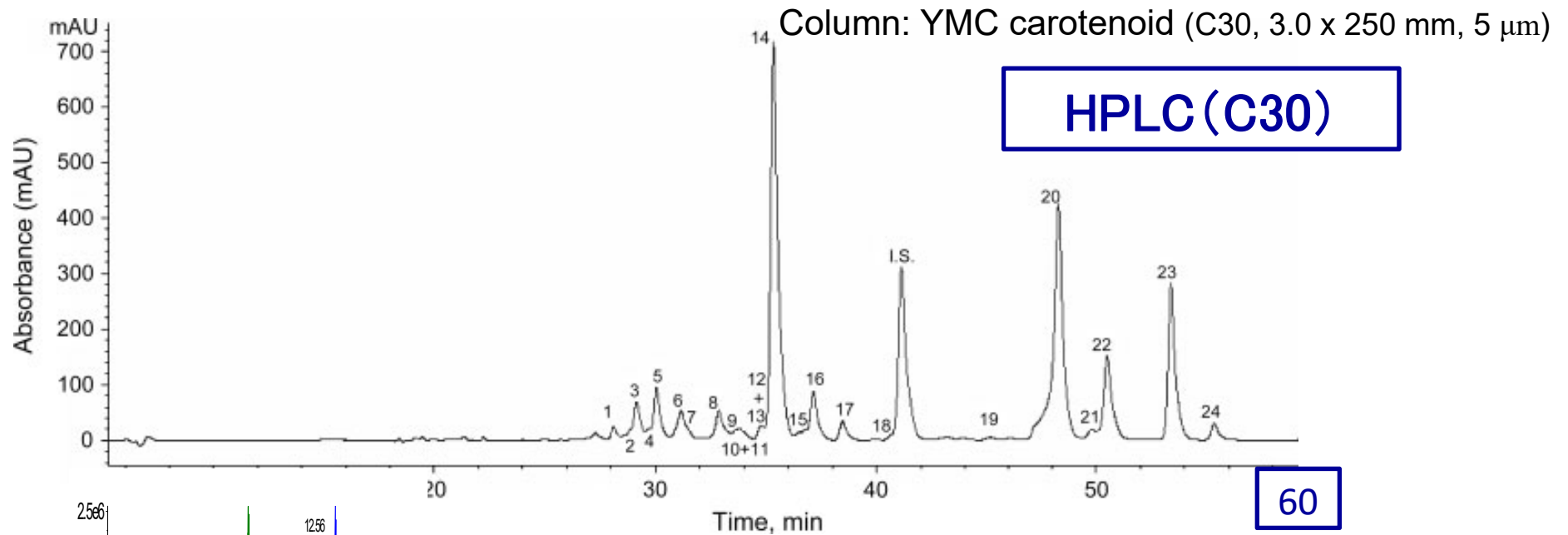


水溶性化合物から脂溶性化合物まで幅広い成分の一斉分析が可能

SFCの特徴

- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能, GCの代わりとしても)
- **高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)**
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- 高分子成分への対応
- 分取への拡張性

カロテノイド分析におけるSFC/MSとLC/DADの比較



(Crupi, P. et al., *Journal of Mass Spectrometry*, 2010)

装置	検出限界 (fmol)	溶媒	文献
LC-DAD	2000	AcCN/MeOH/CH ₂ Cl ₂	T. H. Kao et al. (2011)
LC-MS (APCI)	1000	MeOH/MTBE	T. Lacker et al. (1999)
LC-MS (ESI)	900	AcCN/MeOH/CH ₂ Cl ₂	M. Carei et al. (1999)
SFC-MS (ESI)	64	SCCO₂/MeOH	A. Matsubara et al. (2009)
SFC-MS/MS (ESI)	0.093	SCCO₂/MeOH	A. Matsubara et al. (2012)

SFCの特徴

- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能, GCの代わりとしても)
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- **超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能**
- 高分子成分への対応
- 分取への拡張性

オンラインSFE-SFCの有用性

- 前処理を含めた分析操作を自動化できる
- 不安定な化合物分析に適応できる
 - 光に不安定・酸化され易い・加水分解し易い化合物に有効
- 目的成分の負荷量を多くできるため超高感度分析が可能
 - これまで感度不足で分析できなかった成分や濃縮の前処理が必要であった成分などの分析に有効
- 少ない試料量で分析できる

SFE-SFCを用いた前処理操作による 時間と労力の削減

● 従来法(QuEChERS)の前処理



GC-MS



LC-MS

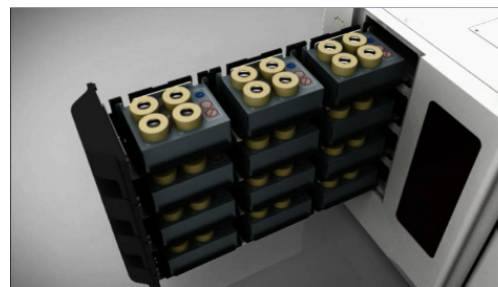
● Nexera UCの前処理



約30分
短縮

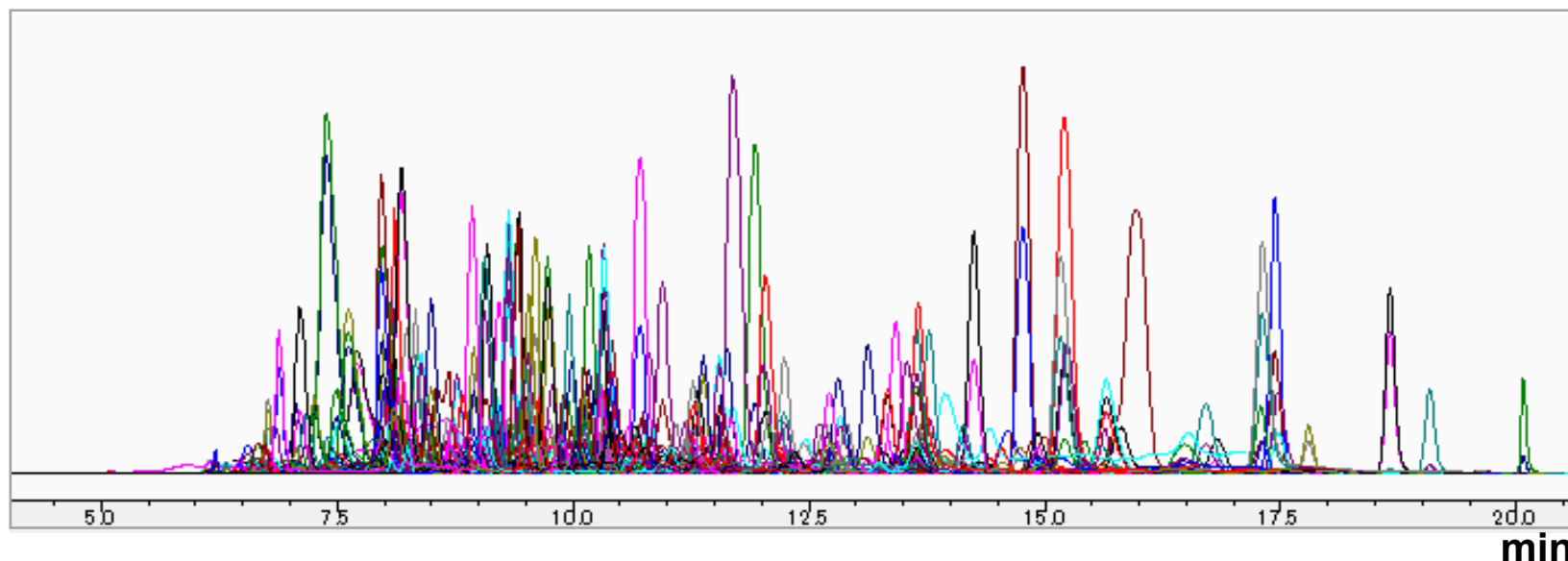


水分の多い試料の脱水処理に有効



ラックチェンジャにより
最大48検体の連続抽出と
分析が可能

オンラインSFE-SFC/MS による残留農薬分析



MRM chromatogram of pesticides in sweet potato at 100 ng

Number of pesticides with peak area RSD % < 30

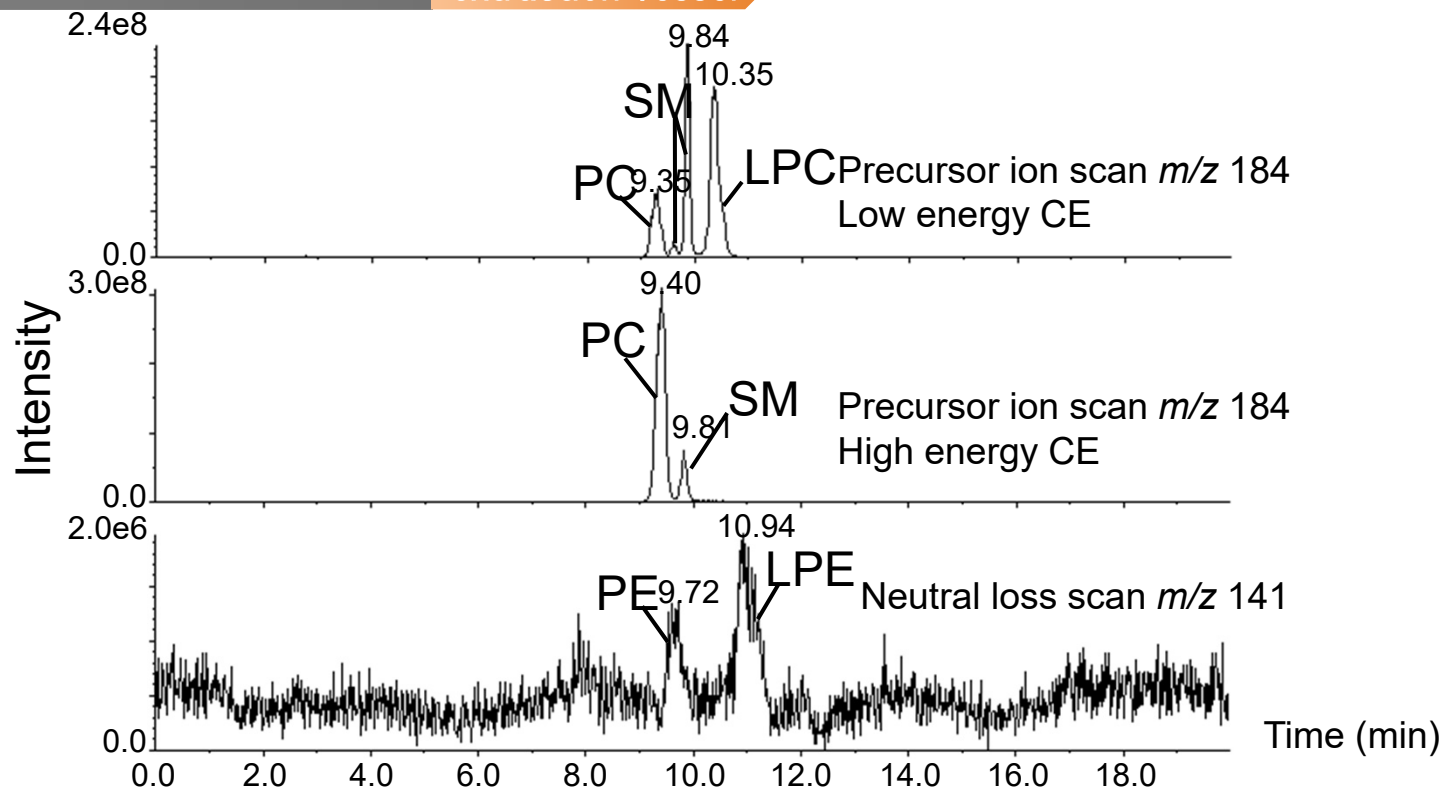
	Brown rice	Spinach	Cabbage	Sweet potato	Apple	Green tea	Average
10 ng	366	279	355	349	360	313	337(60%) ^a
100 ng	445	368	428	422	421	442	421(75%)

^a Number of reliably analyzed pesticides/Number of added pesticides × 100(%)

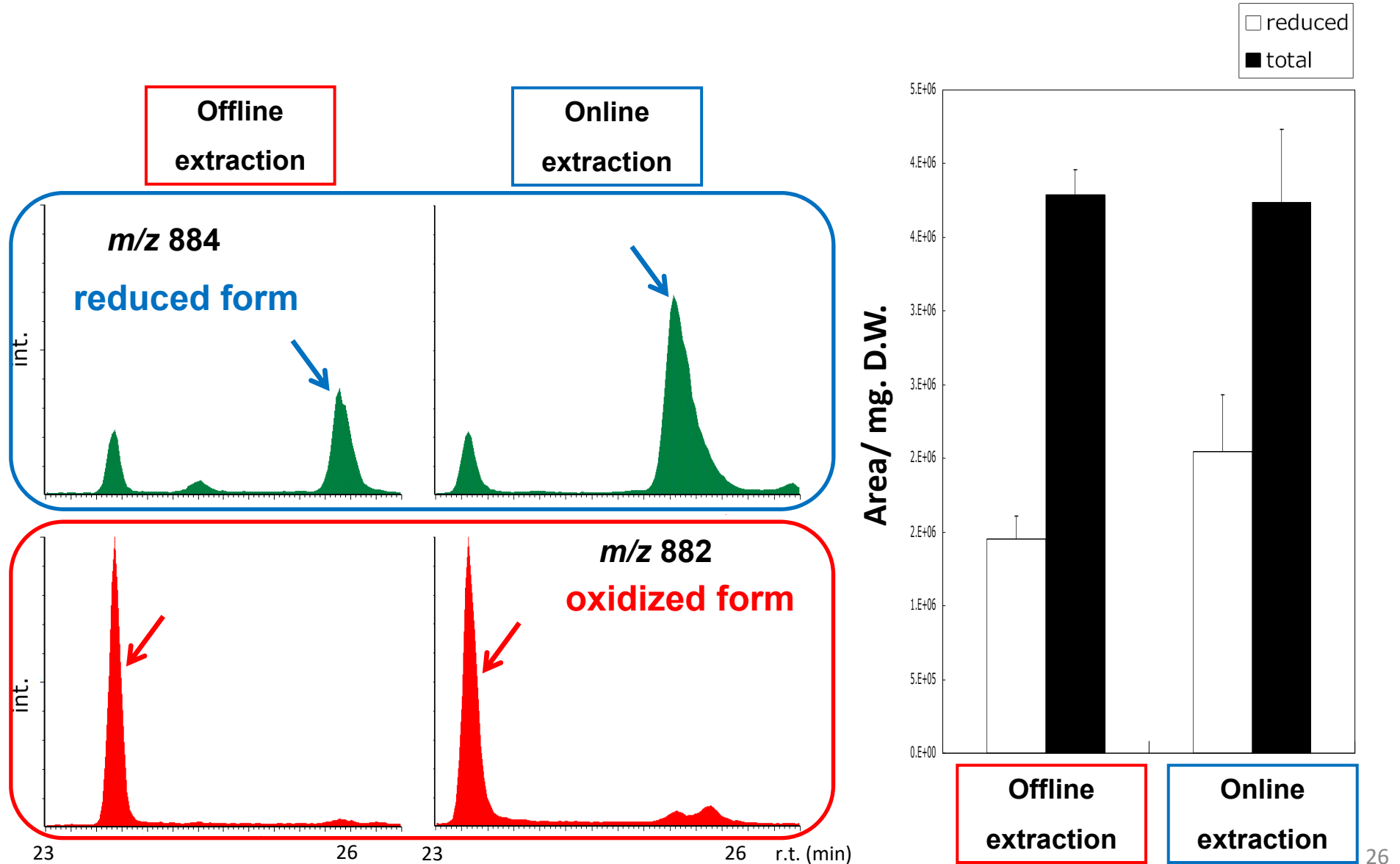
乾燥血漿スポット (DPS) 中リン脂質の オンライン SFE-SFC/MS/MS 分析

Conventional LC/MS Method

Online SFE-SFC/MS

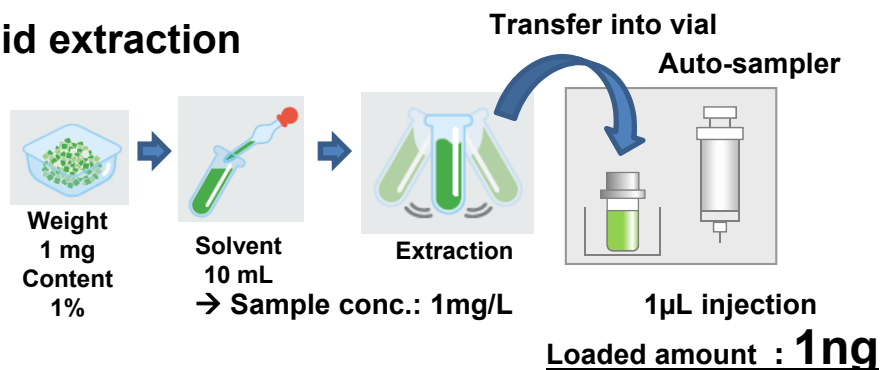


オンライン SFE-SFC-MS による 光合成細菌 *R. sphaeroides* 中 CoQ₁₀ 酸化体・還元体の精密分析



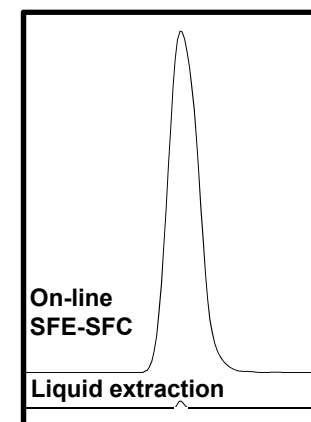
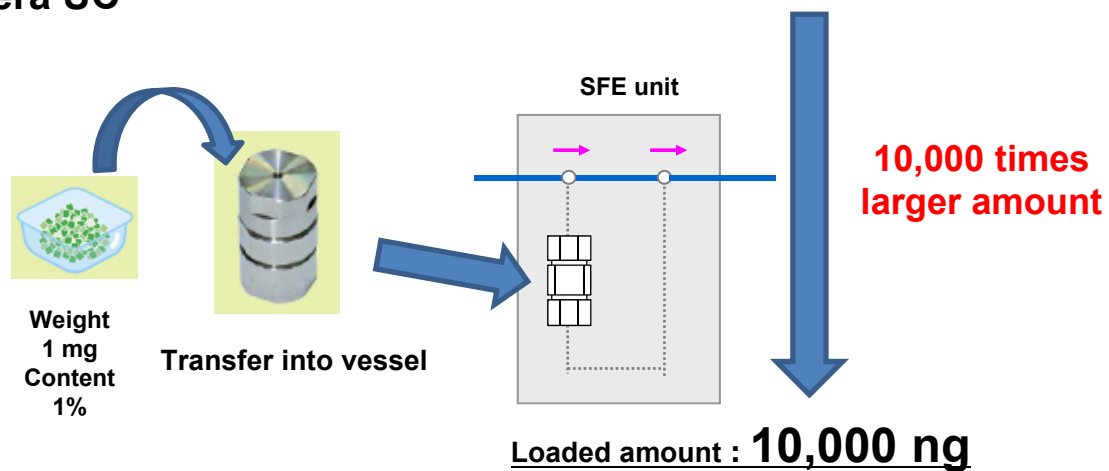
オンラインSFE-SFCの有用性(高感度化)

Liquid extraction



Solvent extraction itself means dilution

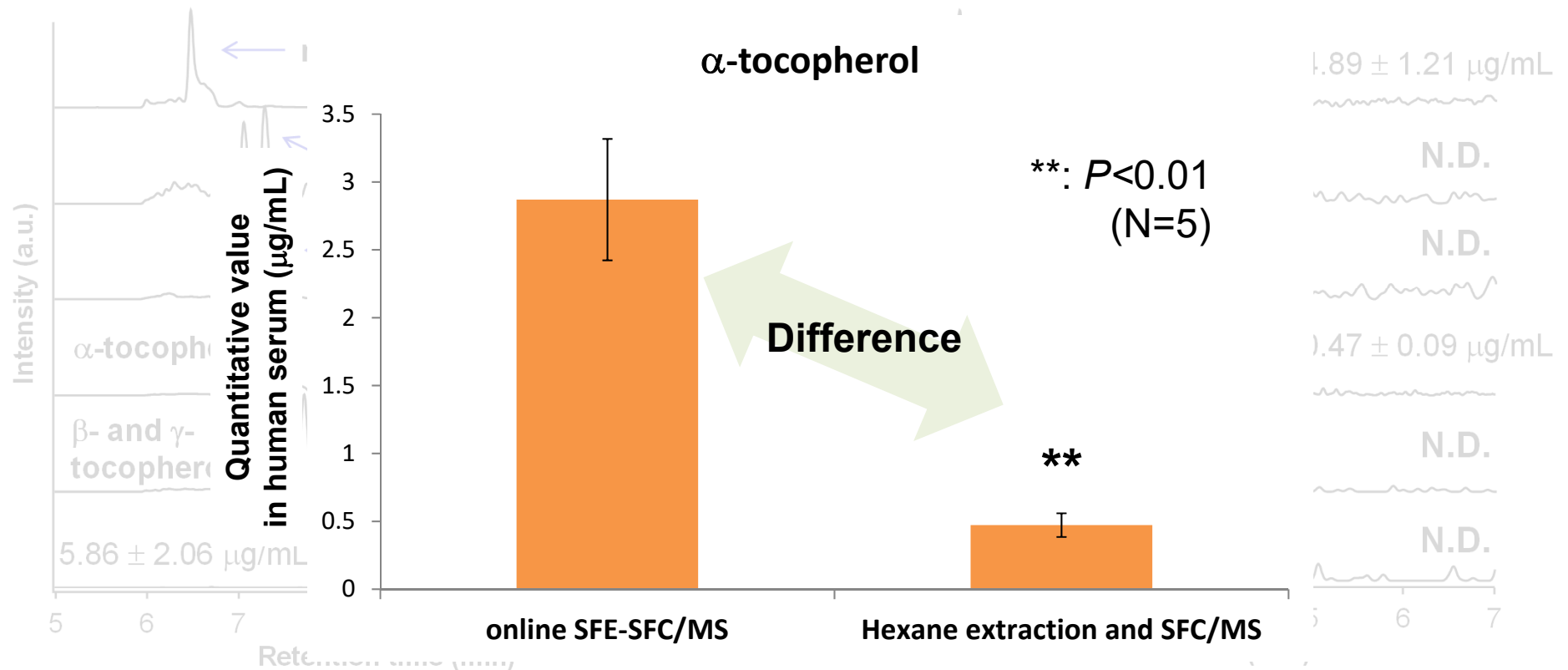
Nexera UC



オンラインSFE-SFC-MSによる脂溶性ビタミンの一斉分析

Online SFE-SFC/MS analysis

Hexane extraction and SFC/MS analysis



Using online SFE-SFC/MS/MS method, 6 kinds of FSVs could be quantified within 25 minutes.

SFEによるDBS中代謝物の抽出

サンプル



- 使用ろ紙 : BondElut DMSカード (Agilent)
- ↓ 3 mm IDのパンチにより切り出し
- ↓ 酸化防止剤ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 0.05% アセトン溶液を30 μ l滴下
- ↓ 10分ほど乾燥
- ↓ ヒト血清 (内標として30 μ Mの2-bromohypoxanthineおよび2.4 μ MのPC(12:0_12:0)を含む)を15 μ l滴下
- ↓ 二時間以上室温で乾燥させた。

抽出

- 抽出モード : Dynamic
- モディファイヤー : MeOH
- 回収方法 : バブリング

前処理

- 減圧遠心機により乾燥
- ↓ 50 μ l H₂Oにより再溶解→カチオン分析へ
- 50 μ l MeOH により再溶解→脂質分析へ

分析

カチオン: アミノ酸、核酸塩基および関連代謝物
ペンタフルオロフェニルカラム

脂質: ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジリエタノールアミン (PE)、脂肪酸、胆汁酸、アシルカルニチン
ODSカラム

DBS中代謝物のSFEと有機溶媒抽出との比較

SFE条件→CO₂: 1.8 ml/min, MeOH: 0.3 ml/min, 30°C, 20 MPa

LLE条件→2 ml MeOHを添加し、60分静置し、遠心分離後回収した上清を回収

	カチオン		脂質	
	Detected	RSD<20	Detected	RSD<20
SFE	37	17	194	143
LLE	36	22	185	125

- カチオン、脂質合わせて200以上の代謝物が検出され、そのうち160程度の代謝物はRSD<20%と安定に分析することができた。
- 有機溶媒液抽出(LLE)と比較して有意な差が認められた代謝物を挙げると、SFEは脂質類に対して、LLEがカチオン類に対して、高い抽出効率を示したことが分かった。
- 検出された代謝物数に大差はなく、MeOHを少量添加することで多くの親水性代謝物の抽出に成功した。

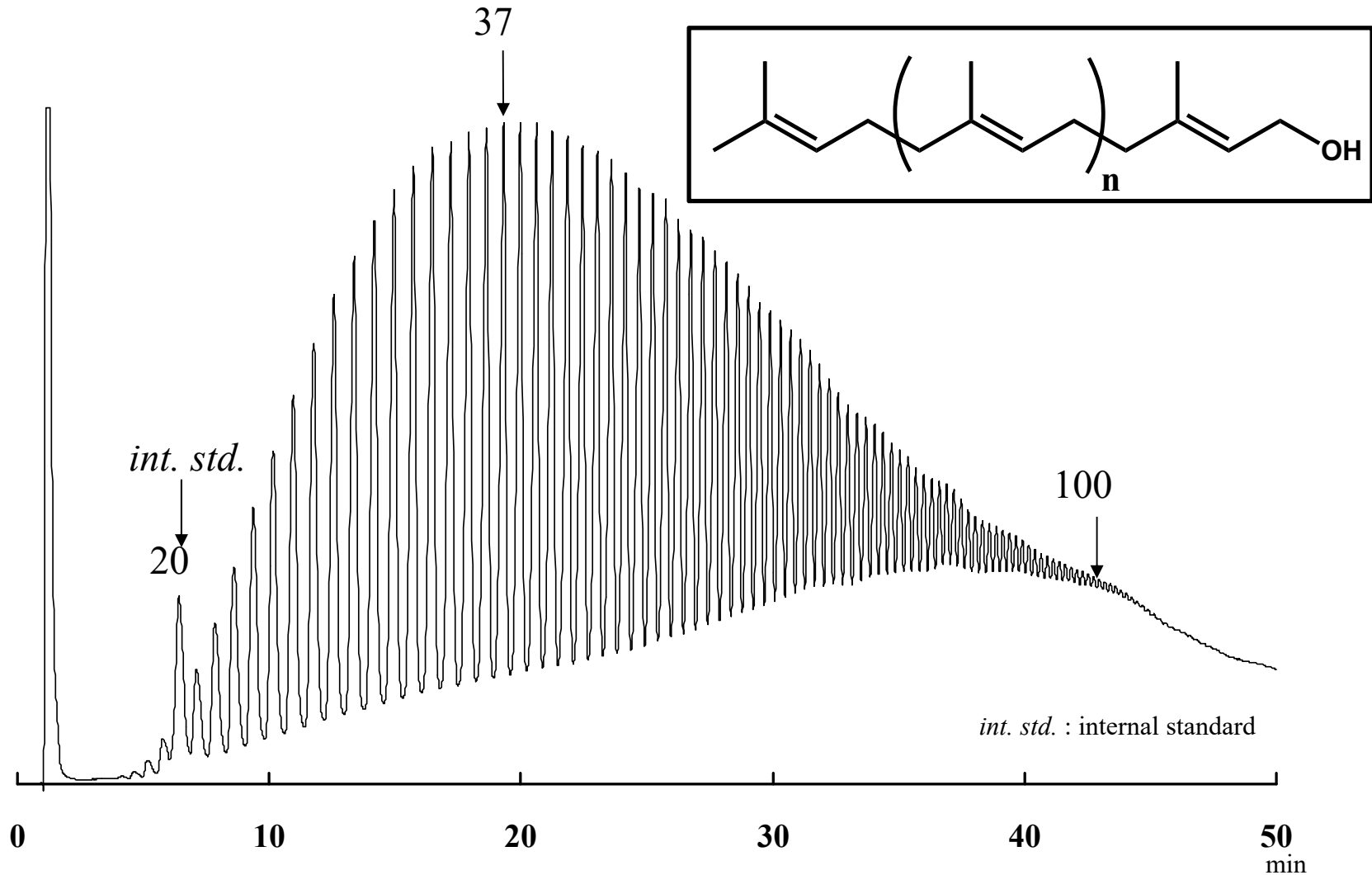
SFEが有意に高かった	LLEが有意に高かった
LPC_14-0 (sn-1)	Glycine
PC_16-0e_16-0	Guanosine
PC_16-0_18-2 PC_16-1_18-1	Hypoxanthine
PC_18-1_18-1 PC_18-0_18-2	L-Alanine
PC_17-0_20-4	L-Arginine
PC_18-0_20-4	L-Citrulline
PC_18-1_22-6	L-Glutamate
PE_16-1_18-1 PE_16-0_18-2	L-Histidine
PE_16-0_18-1	L-Homoserine
PE_16-0_20-4	L-Lysine
PE_18-1_18-2	L-Serine
PE_18-1_18-1 PE_18-0_18-2	L-Threonine
FA_14-1_Myristoleic acid	L-Tryptophan
FA_14-0_Myristic acid	L-Tyrosine
FA_15-0_Pentadecylic acid	DMG
FA_16-1_Palmitoleic acid	Taurine
FA_17-1_10-Heptadecanoic acid	L-Kynurenine
FA_21-0_Heneicosanoic acid	Phosphocholine
FA_22-1 (n-9)_Erucic acid	
FA_23-0_Tricosanoic acid	
FA_24-1 (n-9)_Nervonic acid	
FA_24-0_Lignoceric acid	
FA_25-0_Pentacosanoic acid	
FA_27-0_Heptacosanoic acid	

赤字: その抽出法によってのみ検出された代謝物 30
Matsubara, A., et al., *J. Chromatogra. B*, **969**, 199 (2014)

SFCの特徴

- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能, GCの代わりとしても)
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- **高分子成分への対応**
- 分取への拡張性

SFC による長鎖ポリプレノールの分析



Column : Inertsil Ph-3 (250 × 4.6 mm I.D., GL Sciences)

CO₂ flow : 3.0 ml/min

Modifier flow : THF, 0.8 → 2.0 ml/min, 30 min

Temp. condition : 80 °C (hold)

Back press. : 19.6 Mpa

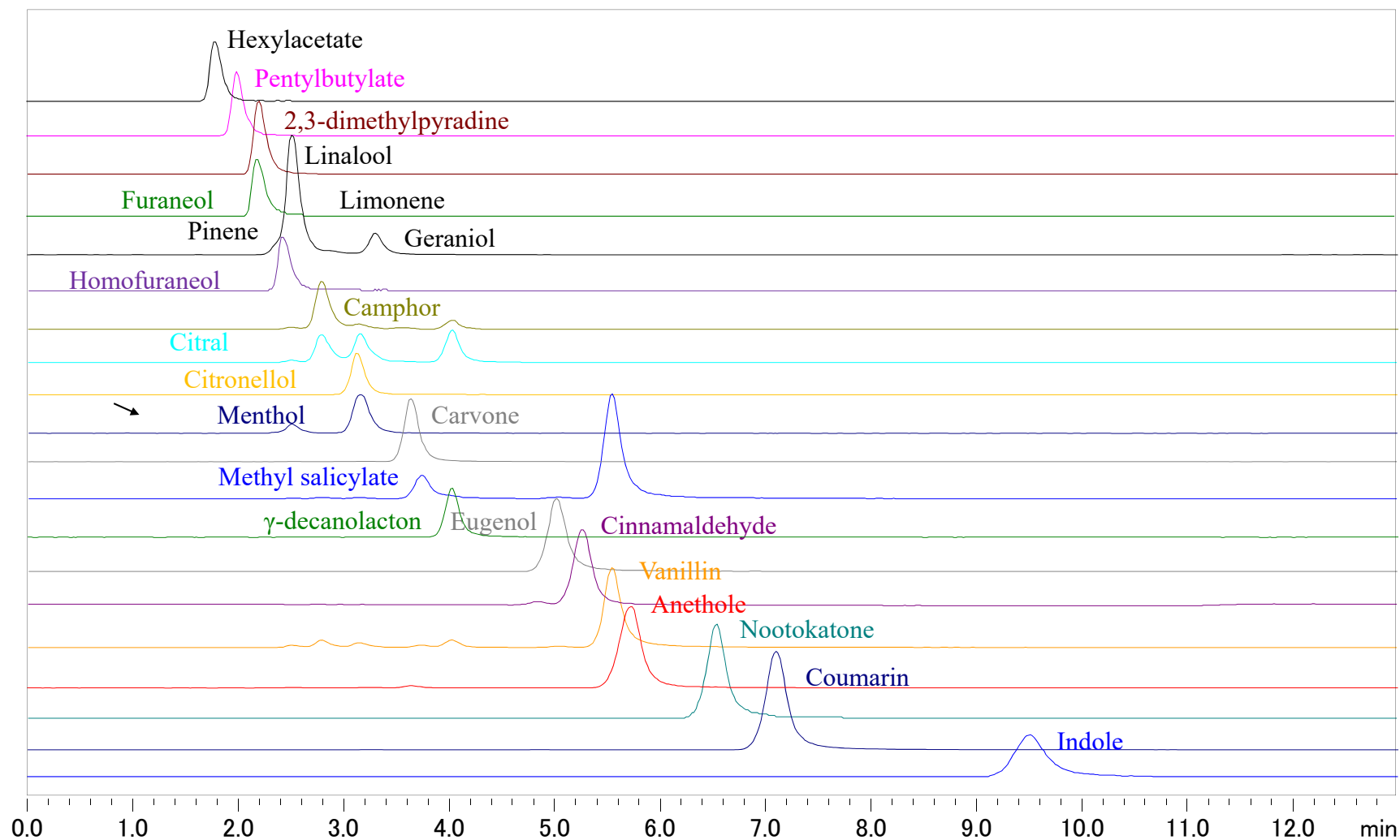
Detection : UV 210 nm

Bamba, T., et al., *J. Chromatogr. A*, **955**, 203 (2003)

SFCの特徴

- 高い分離能(カラムの連結により分離能を向上させることが可能)
- 網羅性(幅広い性質の化合物に適用可能, GCの代わりとしても)
- 他にない分離モード(順相+逆相)
- 高疎水性化合物の高感度分析(質量分析)
- 超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン化が可能
- 高分子成分への対応
- **分取への拡張性**

新規ポリマーカラムを用いたSFC/MSによる 揮発性化合物の分離



超臨界流体利用技術 (SFC, SFE) の可能性

- 脂質メタボロミクス
リン脂質以外の脂質も対象
- 酸化脂質メタボロミクス
不飽和脂肪酸結合脂質, 短鎖アルデヒド, 抗酸化物質
- 食品, 生薬の品質検査, 機能解析
- 各種ハイスループットスクリーニング
 - 残留農薬分析
 - 毒性, 安全性評価
 - バイオマーカー探索
 - 臨床検査
オンラインSFE-SFC/MSによる血液試料の直接分析
自動分析システムの構築

超臨界流体抽出・分離技術の課題

- SFCにおける理論構築
 - 分離挙動の解析⇒最適な固定相, 移動相選択
 - 超臨界流体(亜臨界)における溶解性解析
⇒UCへの応用
 - SFCの特徴を活かした分離技術の開発
⇒新たな固定相の開発
- SFEにおける理論構築
 - 超臨界流体(亜臨界)における溶解性解析
⇒SFEによる成分分画の高度化
 オンラインSFE-SFCへの応用
 - SFEの特徴を活かした抽出技術の開発
- 装置の完成度
 - さらなる技術開発, 装置開発

SFC研究会 (<http://sfc-forum.org/>)

SFC研究会
Japan Society for SFC

会員ログイン
お問い合わせ
サイトマップ

SFCとは?
About SFC

研究会について
About Forum

お知らせ
News

活動状況
Activity

発表資料
Publication

入会のご案内
Registrations

関連リンク
Links

Waters
THE SCIENCE OF
WHAT'S POSSIBLE.
DAICEL
株式会社ダイセル

お知らせ

- 2013年05月01日 ★第9回 SFC研究会（夏の勉強会#2）開催のご案内★
- 2013年02月18日 第8回 SFC研究会の資料を公開いたしました
- 2012年08月07日 【終了】第8回 SFC研究会開催のお知らせ
- 2012年05月10日 ホームページサーバーメンテナンスのお知らせ（終了）
- 2012年03月02日 第6回 SFC研究会の講演資料を会員ページにて公開しました

更新履歴

- 2013年03月14日 サイト内容・構造等を変更しました。
- 2012年01月16日 参加受付方法と、マイページを一部変更しました。
- 2011年02月12日 サイト内容を一部変更しました。
- 2010年01月20日 WEBサイトを公開しました。

[トップページ](#) [個人情報の取り扱いについて](#)

W3C XHTML 1.0 W3C CSS

© 2013 Japan Society for SFC. All rights reserved.

第25回 SFC研究会:2023年 2月3日(金)
Shimadzu Tokyo Innovation Plaza(島津製作所 殿町事業所) 37

