



Title	新規スプリットフロー技術開発に基づく超臨界流体抽出一超臨界流体クロマトグラフィーシステム基盤技術の構築
Author(s)	酒井, 美穂
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76509
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

新規スプリットフロー技術開発に基づく
超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーシステム
基盤技術の構築

酒井 美穂

2020年 1月

大阪大学大学院工学研究科

・目次

略語	1
第1章 緒論	3
1.1. 超臨界流体二酸化炭素による抽出	3
1.2. 超臨界流体クロマトグラフィー	9
1.3. 超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーシステム	12
1.4. 本研究の目的	16
第2章 SFE-SFCシステムの実用化に資する新規スプリット技術の開発	19
2.1. 諸言	19
2.2. 実験材料および実験方法	19
2.2.1. 試薬および装置	19
2.2.2. 試料調製方法	23
2.3. 結果および考察	24
2.3.1. SFC-PDA分析条件の検討	24
2.3.2. BPRの差圧とカラムへのスプリット導入挙動	25
2.3.3. スプリットにおける分岐割合影響要素の解析	33
2.4. 小括	42
第3章 新規スプリットフロー技術に基づくSFE-SFCシステムの開発	45
3.1. 諸言	45
3.2. 実験材料および実験方法	46
3.2.1. 試薬および装置	46
3.2.2. 試料調製方法	50

3.2.3. オートサンプラーおよび SFE からの試料注入条件	51
3.2.4. スプリットフロー条件.....	51
3.2.5. SFC-PDA および SFC/MS の分析条件.....	52
3.3. 結果および考察.....	53
3.3.1. SFC/MS 分析条件の検討	53
3.3.2. SFE 抽出条件の検討	55
3.3.3. スプリットフローの条件検討.....	58
3.3.4. 新規スプリットフロー技術を統合した SFE-SFC/MS による抽出物部分導入と SFC における分離挙動	59
3.3.5. タンデムクロマトグラフィー—SFC による分離性能の改善	62
3.3.6. SFE-SFC における SFE 抽出効率算出のためのオートサンプラー標準導入シス テムの開発	67
3.3.7. オートサンプラーから注入した標準の注入バンド幅拡張とスプリット比同一化の ための検討.....	67
3.3.8. オートサンプラー標準導入システムによる SFE 抽出効率算出精度の検証.....	70
3.3.9. 実試料を用いた SFE-SFC システムの評価	73
3.4. 小括	75
第 4 章 総括と今後の展望.....	77
引用文献	80
発表論文	85
学会発表	86
謝辞	87

略語

SF: Supercritical fluid, 超臨界流体

SCCO₂: Supercritical carbon dioxide, 超臨界二酸化炭素

Tc: Critical temperature, 臨界温度

Pc: Critical pressure, 臨界圧力

SFE: Supercritical fluid extraction, 超臨界流体抽出

BPR: Back pressure regulator, 背圧調整器

SFC: Supercritical fluid chromatography, 超臨界流体クロマトグラフィー

HPGC: High pressure Gas chromatography, 高圧ガスクロマトグラフィー

GC: Gas chromatography, ガスクロマトグラフィー

LC: Liquid chromatography, 液体クロマトグラフィー

HPLC: High performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー

NPLC: Normal phase liquid chromatography, 順相液体クロマトグラフィー

ODS: Octadecylsilyl, オクタデシルシリル基

TMS: Trimethylsilyl, トリメチルシリル基

FID: Flame ionization detector, 水素イオン化検出器

UV: ultraviolet spectrometer, 紫外分光器

UV/Vis: ultraviolet-visible spectrometer, 紫外・可視分光光度計

PDA: Photodiode array, フォトダイオードアレイ

HILIC: Hydrophilic interaction chromatography, 親水性相互作用クロマトグラフィー

MS: Mass spectrometry, 質量分析

MRM: Multiple reaction monitoring, 多重反応モニタリング

TC: Tandem chromatography, タンデムクロマトグラフィー

TC-SFC: Tandem chromatography- Supercritical fluid chromatography, タンデムクロマトグラフ
ィー-超臨界流体クロマトグラフィー

第1章 緒論

1.1. 超臨界流体二酸化炭素による抽出

超臨界流体(Supercritical fluid: SF)の発見は、1822年フランスの C.Cagniard de LaTour による大砲の砲身を用いた実験によってアルコールの臨界点が見出されたことに起因する。大砲の砲身を加工して製作した密閉容器にアルコールと石を入れ容器を動かしながら加熱を続けたところ、石が液体中を転がって「ぱちやぱちや」と聞こえていた音が、一定の条件で音がしなくなったことから、高温で液体の存在がなくなることを発見した。その後 1869 年に T. Andrews によって二酸化炭素について圧力－体積－温度の関係の系統的研究が行われ、「Critical point(臨界点)」の名称が用いられた[1]。超臨界流体とは物質の臨界点を超えた温度、圧力下にある物質のことを指す。表 1-1 に示すとおり、その粘度は気体様に低く、拡散係数は気体と液体の中間をとる。また、密度は気体に比べてはるかに大きく、液体並みである。このような超臨界流体の低い粘度は、システム圧の上昇を緩やかにするため、早い流量での操作を可能とする。液体より高い拡散性は、溶質との接触の機会を増加させるため、液体溶媒と比較して迅速な処理を可能にする。また、液体並みの密度は、液体に匹敵する溶解力を持つことを示す。このような特徴から、超臨界流体は、抽出溶媒やクロマトグラフィーの移動相として非常に好適であると言える。

表 1-1. 物質の各状態における物性値の比較。

物性	気体	超臨界流体	液体
密度(kg/m ³)	0.6～2	200～900	600～1 600
粘度(Pa·s)	10^{-5}	$10^{-5} \sim 10^{-4}$	10^{-3}
拡散係数(m ² /s)	10^{-5}	$10^{-7} \sim 10^{-8}$	$<10^{-9}$

表 1-2 に示す代表的な超臨界流体のうち、超臨界流体二酸化炭素は最も利用されている流体である。それは以下の理由からである。二酸化炭素は、室温付近で超臨界状態となるため、溶媒として用いた時に溶質の変性の心配が少ない。エタンおよび亜酸化窒素も室温付近の臨界温度を持つが、二酸化炭素は低毒性である点において取扱いが容易である。また、二酸化炭素は無極性であるが、極性溶媒（モディファイアと後述）と混和可能であるため、極性をダイナミックに変化させることができる。モディファイアの種類は、通常溶質に合わせて選択されるが、その高い極性と二酸化炭素への溶解性からメタノールが良く利用されている[2]。ただし図 1-1 に示すように、過剰なモディファイアの添加は、超臨界流体から気体および液体を含む相へ分離を引き起こす。図 1-1 から 313.15 K（約 40°C）では、圧力 8 MPa のときに二酸化炭素モル分率 60%程度で相分離を引き起こすことがわかる。このような相分離は、超臨界流体の安定な使用に支障をきたすため、モディファイアの添加量やその時の温度や圧力の設定には注意が必要である。

表 1-2. 代表的な超臨界流体の臨界定数と極性。

物質	臨界温度 (°C)	臨界圧力 (MPa)	双極子モーメント (D)
メタン(CH ₄)	-82.7	4.60	0.0
エチレン(C ₂ H ₄)	9.2	5.04	0.0
二酸化炭素(CO ₂)	31.0	7.38	0.0
エタン(C ₂ H ₆)	32.3	4.88	0.0
亜酸化窒素(N ₂ O)	36.5	7.24	0.2
プロピレン(C ₃ H ₆)	91.8	4.60	0.4
クロロジフルオロメタン(CClF ₂)	96.2	4.97	1.4
プロパン(C ₃ H ₈)	96.7	4.25	0.0
ジクロロジフルオロメタン (CCl ₂ F ₂)	111.9	4.14	0.5
アンモニア(NH ₃)	132.4	11.35	1.5
メタノール(CH ₃ OH)	239.5	8.09	1.7
ベンゼン(C ₆ H ₆)	289.1	4.89	0.0
トルエン(C ₇ H ₈)	318.7	4.10	0.4
水(H ₂ O)	374.2	22.12	0.8

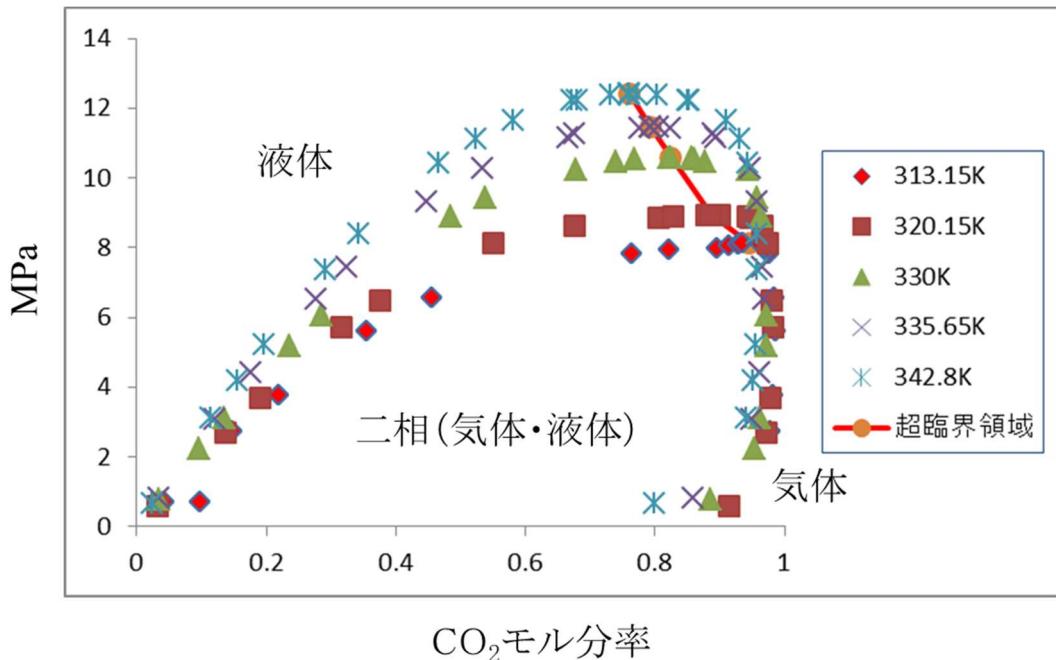


図 1-1. 二成分系の相平衡(二酸化炭素-メタノール). 文献[3]のデータに基づき作成.

超臨界流体抽出(Supercritical fluid extraction: SFE)は、超臨界流体を媒体とした抽出技術である。1879年, J. B. Hannay, J. Hogarthにより、超臨界流体に物質を良く溶かす性質があることが発表されると、超臨界流体の抽出媒体としての利用の研究が進んだ。中でも超臨界流体二酸化炭素を媒体とした抽出は、グリーンケミストリーの観点から、有害な有機溶媒や高エネルギー使用を伴う従来抽出技術の代替え技術として注目を集め、1971年、コーヒー豆からのカフェイン抽出が初めて工業化され、その後ビールの風味付けのためのホップエキスの抽出も大規模に工業化された。現在でも食品や天然植物からの香料や色素の抽出や、卵黄からのコレステロールの除去に利用されている。また1980年代前半から成分分析手法としても検討が始まり[4]、現在ではクロマトグラフィーの前処理法として広く用いられている。それは従来の溶媒抽出に比較した以下の利点からである[2]。1) 超臨界流体二酸化炭素の低い粘性および高い拡散性は、液体溶媒よりはるかに速い物質移動をもたらし、より速い抽出を可能にする。例えば、固液抽出で数時間が必要とする時に、SFEでは数十分に短縮できる[5, 6]。2) また超臨界流体二酸化炭素の溶解力は圧力や温度を変えること

で操作できるため、高い選択性を達成し得る。例えば、抽出圧力を設定することにより、唐辛子からの色素と辛味の分離が実用化されている他、香料の抽出においては、植物から抽出される化合物の超臨界流体二酸化炭素への溶解度に基づいて、操作条件の最適化がなされている[7]。3) 超臨界流体二酸化炭素に溶解した溶質は、大気圧に減圧して二酸化炭素を気化させることによって容易に分離することができる。4) そのため、通常は時間がかかり、揮発性成分が失われることが多いサンプル濃縮プロセスを排除できる。5) 超臨界流体二酸化炭素の低い臨界温度から低温で操作できるため、熱に不安定な化合物を対象とすることができる。6) 超臨界流体二酸化炭素は大気圧に戻すことによって容易に装置から取り除くことができるため、クロマトグラフィーとのオンライン結合が可能である。7) 有機溶媒を全く使用しないか、あるいは比較的少ない使用で抽出を可能にする。8) 超臨界流体二酸化炭素は低極性媒体であるが、モディファイアを添加することで目的の極性を得るために、抽出効率の向上や抽出時間の短縮が期待される[8]。図 1-2 に一般的な分析スケール SFE システムを示す。

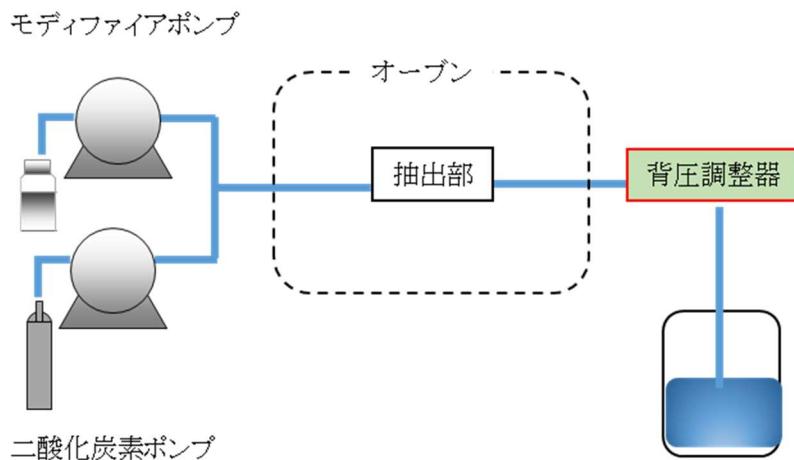


図 1-2. 分析スケール SFE の概要図。

システムは、二酸化炭素高压ボンベ、二酸化炭素ポンプ、二酸化炭素ポンプ内蔵冷却用熱交換器、モディファイアポンプ、抽出チャンバー、背圧調整器、サンプルコレクターから構成され、背圧調整器はレストリクターと機械的な調整器(Back pressure regulator: BPR)の 2

種類がある。レストレスターは、細い内径の配管で構成され、媒体の流量によって生じる背圧によって圧力が決定されるため、流量と圧力を独立して制御することができない。一方 BPR（図 1-3）は、出口圧力をモニターして、設定圧力になるようバルブニードルと加熱されたバルブシートが動くことで流路が開閉されるため、媒体流量に依存せずに圧力を維持することができる[9]。現在のシステムのほとんどで、背圧調整器として BPR が採用されている。

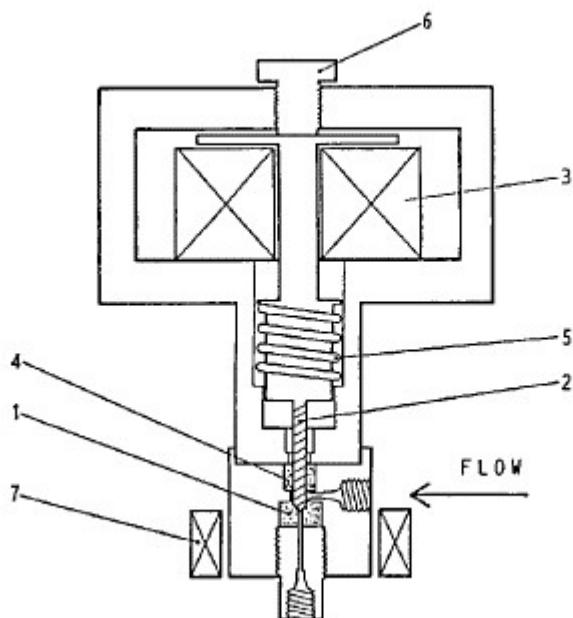


図 1-3. BPR の概要。

1, バルブシート; 2, バルブニードル; 3, ニードルドライブソレノイド; 4, ニードルシート; 5, スプリング; 6, 調節スクリュー; 7, ヒーター。文献[9]より許可を得て転載。

抽出プロセスは 1) 超臨界流体二酸化炭素による試料からの分析種の抽出, 2) 超臨界流体二酸化炭素からの分析種の分離および回収の大きく 2 つからなる。二酸化炭素高压ポンベから供給された二酸化炭素は、熱交換器による冷却により液化状態のまま(必要があればモディファイアと同時に)抽出チャンバーに送液されるが、抽出チャンバーの温度を臨界温度以上に設定するとともに、下流に設置された BPR 圧力を臨界圧力以上に設定することで、抽出管内で超臨界流体二酸化炭素として存在し、分析種を試料から選択的に抽出する。抽出方法は、抽出媒体を静置あるいは循環させる静的抽出(スタティック抽出)および新

鮮な抽出媒体を連続的に抽出管に送り込む動的抽出(ダイナミック抽出)で行われる。分析種を溶解した超臨界流体二酸化炭素は BPR を通過したのち、大気圧に減圧され二酸化炭素へと気化する。気化と同時に二酸化炭素は溶解性を失い、分析種はサンプルコレクターに回収される。超臨界流体二酸化炭素が二酸化炭素へと急激に気化すると冷却が起り、大量のマトリックスや分析種が抽出された場合に詰まりが生じるため、BPR は通常加熱して使用される。

1.2. 超臨界流体クロマトグラフィー

超臨界流体クロマトグラフィー(Supercritical fluid chromatography: SFC)は、超臨界流体を移動相としたクロマトグラフィーである。移動相に用いられる超臨界流体二酸化炭素の高い拡散性、低い粘性から、高流速分析においても分離性能を維持することができる。また、超臨界流体二酸化炭素へのモディファイアの添加により移動相の溶出力を大幅に変化させることができるために、幅広い化合物への適用が可能である。SFC は、SFE の実用化以前の 1962 年に Klesper らによって高圧ガスクロマトグラフィー(High pressure Gas chromatography: HPGC)として報告された。ポリエチレングリコール固定相上でポルフィリンの混合物を分離するために、超臨界フルオロメタンを移動相として使用した。数年後、Sie とその共同研究者らは、超臨界流体二酸化炭素を移動相とし、移動相の圧力増加が分析種の保持係数を減少させることを明らかにし、1970 年代には、圧力プログラミングを備えた SFC 機器が構築された[10]。これは、温度制御を通してのみ保持係数を減少させるガスクロマトグラフィー(Gas chromatography: GC)にない、新しい分離メカニズムであり、熱不安定成分の分析に課題のある温度制御に対して画期的な分離技術とされた。1980 年代に、Novotny らは、パックドカラムを用いて様々な分析種を分離し、カラムの圧力損失が増加するほど分離性能が低下することを見出した[11, 12]。この結果は、カラム全体の圧力を一定にする中空キャピラリーカラム用いた SFC 開発を誘導した。中空キャピラリーカラムとは、GC

カラムと似ており、小さい内径(50 μm)を持ち、シリカキャビラリーの内面は固定相として機能するポリシロキサンのような薄いフィルムでコーティングされている。当時研究に用いられたSFC装置は、GC使用者が優勢であったため、GCのオープンやシリンジポンプなどのモジュールが初期のシステムとして組み込まれた。その後SFCは、液体クロマトグラフィー(Liquid chromatography: LC)，をベースにしてSFCに適合するように改良され、それと同時にパックドカラムの再評価がなされた。その結果、多環芳香族炭化水素を3, 5, 10 μm の粒子径のカラムで分析した時、粒子径が小さくなる、圧力損失が大きくなる条件で、カラム効率は向上した。加えて、同じ粒子径の場合、高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography: HPLC)とSFCの最小理論段相当高さは同じとなったが、SFCの最適な線速度はHPLCの約5倍となった[13]。このことは、パックドカラムを用いたSFCの高速分析適用への可能性を示唆した(図1-4)。

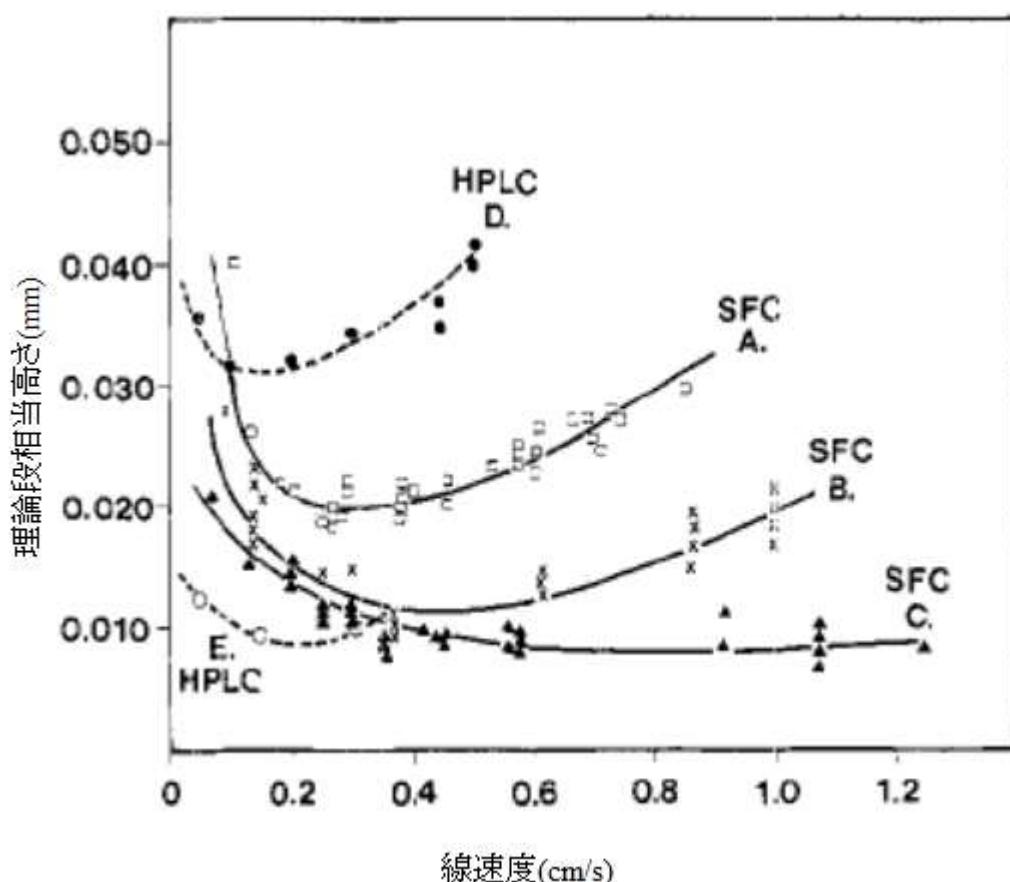


図1-4. 理論段相当高さと線速度。

SFC A, 10 μm ; SFC B, 5 μm ; SFC C, 3 μm ; HPLC D, 10 μm ; HPLC E, 3 μm . 文献(13)より許可を得て転載.

その後、パックドカラムにおける Berger らの報告[14]により、圧力損失に関連した分離性能の低下についての懸念は解消され、1990 年代以降、キャピラリーからパックドカラム SFC へ移行した。当初パックドカラムを用いた SFC は、低極性媒体である超臨界流体二酸化炭素の特性から、移動相の極性が固定相の極性より低い順相液体クロマトグラフィー(Normal phase liquid chromatography, NPLC)に変わる実用的な技術と考えられていたが、移動相へのモディファイア添加や添加物の使用により、その使用範囲は多様な分析種に広がった [15]。さらに 2000 年代には、West と Lesellier は、SFC の包括的な研究をはじめ、溶媒和パラメータモデルによって、溶質の特性と溶質と固定相の間の相互作用の結果に関する情報から、代表的な固定相の属性を特徴付けた[16-18]。これによって、SFC 使用者は、目的化合物に適する固定相の効率的な選択が可能となった。また一般的な保持機構としては、主に固定相の性質に依存すると考えられている。

図 1-5 に SFC の概要図を示す。SFC 装置は一般的に LC の装置から派生したもので [19]、二酸化炭素高圧ボンベ、二酸化炭素ポンプ、二酸化炭素ポンプ内蔵冷却用熱交換器、モディファイアポンプ、インジェクター、オーブン、カラムおよび背圧調整器、検出装置、マイクアップポンプから構成されている。二酸化炭素高圧ボンベから供給された二酸化炭素は、熱交換器による冷却により液化状態のまま(必要があればモディファイアと同時に)分離カラムに送液されるが、カラムオーブンの温度を臨界温度以上に設定するとともに、下流に設置された BPR 圧力を臨界圧力以上に設定することで、系内で超臨界流体二酸化炭素として存在し、対象分析種を試料から選択的に分離する。超臨界流体二酸化炭素は BPR を通過した後に気化して溶解性を失うため、BPR の前あるいは後ろからマイクアップポンプにより有機溶媒を供給して成分を再溶解させ、検出器で検出する。

以上のように、SFC は GC では対象にならない不揮発性成分や熱不安定成分の測定が可能であり、LC に比較して分離性能を維持した高速分析が可能である点において優位性があり、さらにモディファイア添加による移動相の強化や戦略的な固定相の選択により多様な化合物を測定対象とすることができる非常に魅力的な分離技術である。

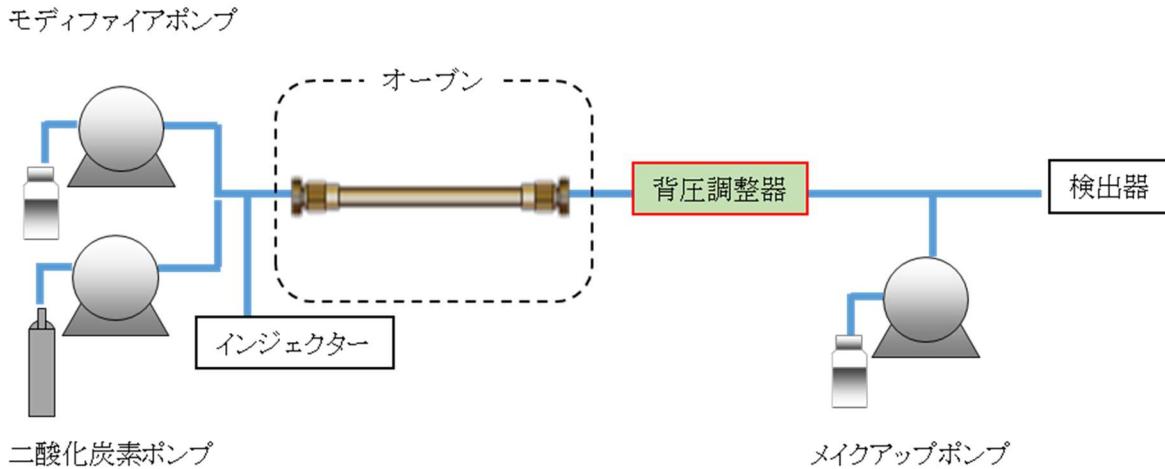


図 1-5. SFC の概要図.

1.3. 超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィーシステム

分析全体の効率と精度を向上させる手法として、抽出法とクロマトグラフィーのオンライン接続は有用である。オンライン接続とは、抽出装置と分離装置を直接接続した閉鎖系システムのことを指し、成分分析プロセス全体の完全自動化により、測定作業全体の簡便化と時間短縮に起因したサンプルスループットの向上を始め、分析対象成分の揮発によるロスや酸素や光による変性、プロセス由来の試料汚染のリスク低減も期待される[20-22]。このようなオンライン接続のメリットと、超臨界流体二酸化炭素の特性および多様な分析種への適応可能性から SFE とパックドカラム SFC をオンライン接続した装置、SFE-SFC システムの開発は 1980 年代から検討されてきた(表 1-3)[23-31]。SFE-SFC の分析プロセスは 1) 超臨界流体二酸化炭素による試料からの目的化合物の抽出と成分の SFC への移送およびカラム先端での捕捉 2) 抽出終了後の目的化合物の SFC 分離および検出、の大きく 2 つからなる。一般に、抽出溶剤を含む抽出物は、SFC に移送される途中で、目的化合物がとどまるよう選択されたプレカラム(分析カラムのみによる先端濃縮も含む)によって選択的に捕捉され、抽出

の終了と同時に流れ込む移動相によってカラム内を移動し良好に分離される。松原らは、超臨界流体抽出—超臨界流体クロマトグラフィー／質量分析(Supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/ mass spectrometry: SFE-SFC/MS)において、プレカラムおよび分析カラムとして、目的化合物であるコエンザイム Q₁₀ が超臨界流体二酸化炭素存在中で強く保持され、モディファイアを含む超臨界流体二酸化炭素で溶出するような逆相カラムを用い、従来の技術では試料調製中に酸化されやすい光合成細菌中のコエンザイム Q₁₀ の分析を達成した[29]。しかしながら、未だ研究段階であり実用化されている SFE-SFC システムはない。それは主に以下の 2 つの理由が考えられる。一つは、カラムによる目的化合物の捕捉が不十分となるケースがあるということである。カラムによる目的化合物の捕捉はそれと同時に流れ込む抽出溶剤の量やモディファイア組成がカラムの許容範囲を超えた場合に、化合物をカラム先端で十分に濃縮できず、結果的にピーク形状が悪化する。実際にこれまでのほとんどの報告が、比較的溶出力の弱い純粋な超臨界流体二酸化炭素を抽出溶剤として採用しており、高い溶出力を持つモディファイアを含有する超臨界流体二酸化炭素を抽出溶剤として採用した場合には、抽出溶媒のモディファイア濃度がピーク形状に影響することが論じられている[30]。これに起因して、分析対象物は、純粋な超臨界流体二酸化炭素で容易に抽出可能な、低極性から中極性の化合物に限られているという現状がある。二つ目に、オンラインシステムは、抽出した試料のごく一部が導入されるオフラインシステムとは対照的に、ほぼ全ての抽出物が分離カラムへ導入される点である。抽出物由来の多量のマトリクスはカラムや検出器において深刻な汚染を引き起こしてしまうため、現状では試料採取量を減らして導入する他ない。これによりマトリクスの影響は低減するが、農産物などの採取部位で成分含有量が大きく異なるような試料においては、試料採取量減少は測定値のばらつきにつながるため、適用が困難と言える。よって、SFE-SFC システムのさらなる実用性向上のためには、SFE からの抽出物を分岐してその一部を SFC へ導入する高スプリット技術の開発が必要と考えた。

表 1-3. SFE-SFC システムの代表的な報告.

対象物	分析種	SFE 条件	SFC 条件	インターフェイス	定量	文献
セイヨウカノコソウ カレーリーフ	—	超臨界流体二酸化炭素, 165 bar 313 K	オクタデシルシリル基 (Octadecylsilyl: ODS), 5pm, 250 × 4 mm, 超臨界流体二酸化炭素: 98 bar, 313 K	バルブ切り替え (サンプルループ) 20 μL	水素炎イオン化 型検出器 (Flame ionization detector: FID)	23
タール, オイル等	汚染物質	超臨界流体二酸化炭素 5.2, 10, 13 MPa, 0, 40, 50°C	シリカゲル, 250 × 4.6 mm, 超臨界流体二酸化炭素: 圧力グラジエント	バルブ切り替え	紫外検出器(UV)	24
土, 薤, 茶	農薬	超臨界流体二酸化炭素, 200 kg cm ⁻² , 50°C	ODS, シリカゲル, 4.6 × 150 mm, 5 μm 超臨界流体二酸化炭素: 4 mL min ⁻¹ , メタノール: 0.1 mL min ⁻¹ , 150 kg cm ⁻² , 50°C	サンプルループ	紫外可視分光 光度計 (Ultraviolet- visible spectrometer: UV/Vis)	25
軟膏	パルミチン酸レチノール, 酢酸トコフェロール	超臨界流体二酸化炭素, 200 kg cm ⁻² , 40°C	ODS, 4.6 × 150 mm, 5 μm 90%超臨界流体二酸化炭素 + 10%エタノール 200 kg cm ⁻² , 40°C	プレカラム, トリメチルシリル (Trimethylsilyl: TMS), 4.6 × 50 mm, 5 μm	UV/Vis	26

土	農薬	超臨界流体二酸化炭素, 20 MPa, 60°C	ODS, 4.6 × 150 mm, 5 µm 超臨界流体二酸化炭素: 10 MPa 1 min, 15 MPa (1 MPa min⁻¹).	プレカラム ODS, 35 × 4.6 mm, 5 µm	UV	27
トウガラシ	カプサイシノイド	超臨界流体二酸化炭素, 200 kg cm⁻², 40°C	シリカゲル, 250 × 4.6 mm, 超臨界流体二酸化炭素: 5 mL min⁻¹, メタノール: 0.3 mL min⁻¹ 200 kg cm⁻², 40°C	プレカラム, シリカ ゲル, 50 × 4.6 mm (Photodiode array: PDA)	フォトダイオード アレイ	28
樹脂	樹脂添加物	超臨界流体二酸化炭素, 110°C, 25MPa	ODS, 4.6 × 150 mm, 5 µm, 室温, 15 MPa	プレカラム, メチル シリコーン, 0.25 mm ×	UV	29
光合成細菌	コエンザイム Q ₁₀	超臨界流体二酸化炭素, 10 MPa, 35°C	ODS, 4.6 × 150 mm, 3 µm, 10 MPa, 超臨界流体二酸化炭素, 0.1%(w/v)ギ酸 アンモニウム-メタノール	プレカラム, ODS 10 × 4.0 mm	質量分析計 (MS)	30
血しょう	リン脂質	10 MPa, 35 °C 超臨界流体二酸化炭素, 0.1%(w/v)ギ酸アンモニ ウム-メタノール	親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography: HILIC), 超臨界流体二酸化炭素, 0.1%(w/v)ギ酸 アンモニウム-メタノール	プレカラム, ODS 10 × 4.0 mm	MS	31

その他の SFE-SFC システムにおける潜在的な問題としては、SFE での抽出効率を算出することが困難な点にある。低い抽出効率は低濃度分析を困難にし、測定再現性の不良を招く。よって抽出効率を把握することは、測定を良好に行うためにとても重要である。抽出効率は、標準(抽出工程を介さない経路で取得)と標準添加試料(抽出工程を介した経路で取得)の目的化合物の任意の量を比較することで明らかにできる。SFE-SFC システムで SFE の抽出効率を算出する場合は、標準はインジェクターから注入し SFC によって予め分析し、標準添加試料は SFE から注入して SFC システムで分析して、得られた 2 つの測定値を比較する。ただし、これら 2 つの値を正しく比較するには、2 つの点を慎重に考慮しなければならない。第一に 2 つの測定は、一方はインジェクターから一方は SFE から注入されるため、SFC への注入量と注入溶媒、注入バンド幅などの注入条件が大きく異なる。これらの違いは目的化合物の保持時間やクロマトグラムの違いに反映されるため、両者を比較することは事実上困難である。正確な比較のためには、標準と標準添加試料の注入条件を等しくする必要がある。第二に、検出器に質量分析法(Mass spectrometry: MS)を用いる場合、マトリクス影響を考慮しなければならない。マトリクスは MS での検出強度に大きく影響するため、標準および標準添加試料のマトリクスは同じでなければならない。よって SFE 抽出効率算出のためには、これら 2 点を達成する新しいシステム開発が必要である。また、これまでに述べた問題点を解決することで、SFE-SFC システムの実用性は飛躍的に向上すると考えられる。

1.4. 本研究の目的

そこで本研究では、SFE-SFC システムの有用性に着目し、実用的システム構築のための技術開発を目的とした。第 2 章では、SFE-SFC システムにおいて、幅広い極性を持つ化合物を良好にカラムで捕捉する手段として、SFE からの抽出物を分岐(スプリット)しその一部を SFC に導入するスプリットフロー法を考案し、技術開発およびその制御要因について解析し

た. 第 3 章では, 開発したスプリットフロー技術を統合した SFE-SFC システムを用いて, 目的化合物のカラム成分捕捉におけるスプリットの有用性を示し, SFE-SFC システムにおける SFE 抽出効率を評価するために開発した新しいサンプル注入システムについて述べた. 第 4 章では本研究の総括と今後の SFE-SFC システムの展望を述べた.

第2章 SFE-SFCシステムの実用化に資する新規スプリット技術の開発

2.1. 諸言

SFE-SFCシステムにおいて、SFEからの流れを分岐してその一部をSFCカラムへ導入するスプリット法はこれまで提案されていない。スプリットを行う場合、一般的にはT字配管を使って流れを分岐する方法が用いられる。この方法では、スプリット比は両流路の配管の内径や長さの配管抵抗を変更することにより調整される。しかし本研究では、SFEからSFCに流入する抽出物量を連続的に調節して最適化することを目的とするため、配管の変更によりスプリット比を制御する、本技術を採用するのは非常に困難であった。加えて、配管抵抗はわずかな移動相条件で変動するため、目的の高いスプリット比を安定して設定するのは現実的に困難である。そこで本研究では、SFCカラム前で分岐した2つの流路（一方は廃棄側流路、他方はSFCカラム側流路）に各々BPRを設置して、両流路出口に任意に圧力差（差圧）を設けることで試料の一部をカラムへ導入する新たなスプリット技術（スプリットフロー技術）を考案した。

本研究では、幅広い極性を持つ農薬9成分をモデル化合物として、任意のBPR差圧(ΔP_{BPR})におけるSFCカラムへの試料導入割合でスプリット挙動を表し、その制御要因を明らかにした。

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. 試薬および装置

ギ酸アンモニウム(99.9%グレード)およびメタノール(LC-MSグレード)は、シグマアルドリッヂ社(米国、ミズーリ州、セントルイス)から購入した。9つの農薬標準品とアセトン(残留農薬およびポリ塩化ビフェニル分析用)は、和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入し

た. 液化 二酸化炭素(99.9%グレード, 日本, 宮崎, 宮崎酸素株式会社)を SFC 移動相として使用した. 選択した農薬成分を表 2-1 に示す. ベンゼンからメタノールに近い溶解性(SP 値: ベンゼン 18.7, メタノール 29.2)を持つ, 幅広い成分を選択した.

表 2-1. 本研究で選択した農薬標準品.

	成分名	分子式	質量	logP _{ow} ^a	SP ^b
1	オキサミル	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	219.3	-0.44	25.9
2	イマゾスルフロン	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₆ O ₅ S	412.8	0.049	31.7
3	シモキサニル	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	198.2	0.59	25.3
4	シクロスルファムロン	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₆ S	421.4	1.41	29.6
5	フルアジナム	C ₁₃ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₄	465.1	3.56	23.5
6	ビラクロホス	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₂ O ₃ PS	360.8	3.77	26.9
7	テフルベンズロン	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	381.1	4.3	21.5
8	クロルフルアズロン	C ₂₀ H ₉ Cl ₃ F ₅ N ₃ O ₃	540.7	5.8	23.2
9	エトフェンプロックス	C ₂₅ H ₂₈ O ₃	376.5	7.05	18.7

^a極性, ^b溶解性パラメータ.

実験には, (株)島津製作所製のプロトタイプ SFC を用い, オートサンプラー(SIL-30AC), 移動相送液ポンプ(LC-30AD), BPR(SFC-30A), メイクアップポンプ(LC-30AD), カラムオーブン(CTO-20AC), フォトダイオードアレイ(Photodiode array: PDA, SPD-M20)検出器, 装置制御およびデータ解析のためのソフトウェア LabSolution(バージョン 1.5.1)を用いた(図 2-1). まず, 考案したスプリットフロー技術のスプリット挙動を正確に把握するため, SFE に比べて注入精度の高いオートサンプラー(注入精度; 面積値の相対標準偏差で約 1%程度)を試料注入に採用した. 最終的には, 後に述べる第 3 章において, 開発したスプリットフロー技術を SFE-SFC システムに組み込んで性能を検証した.

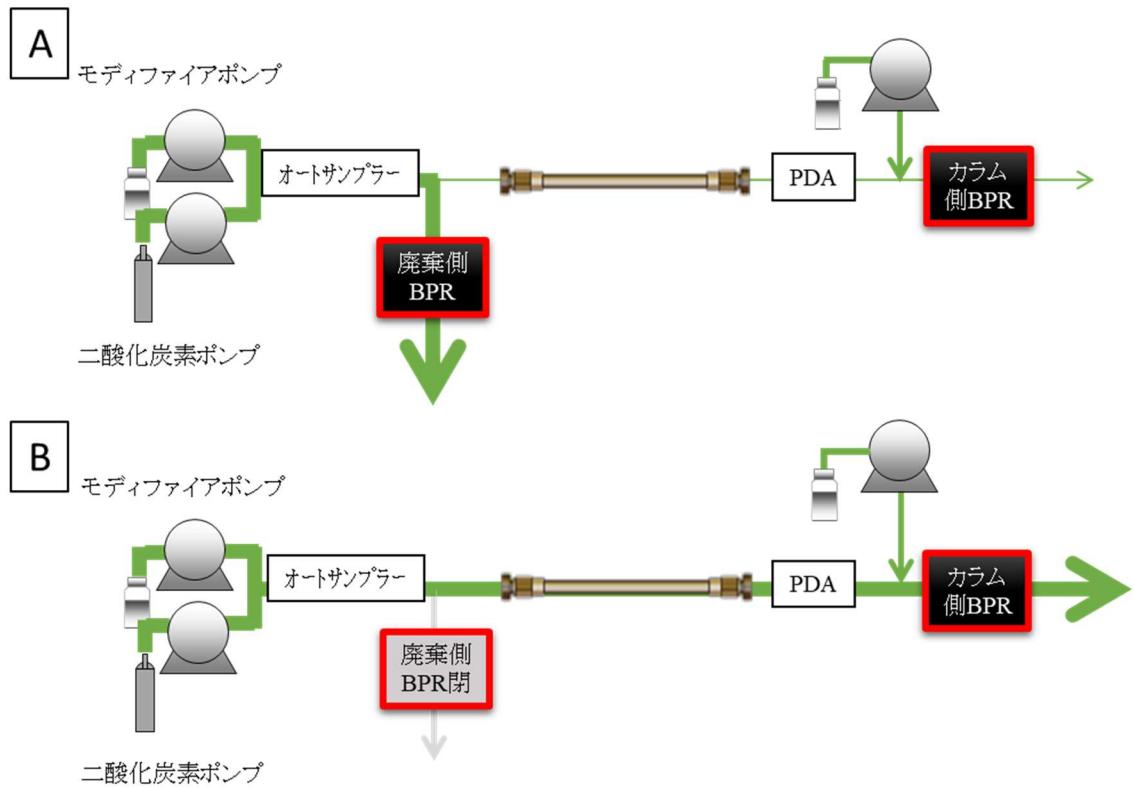


図 2-1. SFC-PDA システムの概略図.

(A)スプリットフロー, (B)分離および検出.

分析は図 2-2 に示す手順で実施した。オートサンプラーから注入された成分は、SFC カラム前で分かれた 2 つの流路(一方は廃棄側流路、他方はカラム側流路)に各々設置された BPR の圧力差によってカラムへスプリット導入され、カラムの先端に濃縮された。その後、スプリット終了と同時に廃棄側 BPR を閉じ、カラムへ流れ込む移動相によって、成分はカラム内を移動し分離、検出された。オートサンプラーからの注入はフルループ注入で行い、以下の条件で実施した。エアギャップ量 ; 0.5 μL, 吸引速度 ; 5.0 μL s⁻¹, 吐出速度 ; 0.2 μL s⁻¹, プレロード容量 ; 15.0 μL. 流れは、出口圧力の低い、抵抗の少ない流路側に誘導されると考えたため、廃棄側 BPR 圧力を固定し、カラム側 BPR 圧力を廃棄側圧力より低くなるよう設定し、カラムへのスプリット導入を制御した。なお、本システムで採用した BPR の設定可能圧力範囲は 10.0 から 40.0 MPa である。スプリットフローは以下の条件で実施した。ス

プリット時間; オートサンプラーから分岐点の T 字配管までの容量が約 60 μL であるため, 注入後 3 倍程度の容量となる約 150 μL が流れるよう流量に応じて設定し, 注入した試料が全てスプリット導入される十分な時間を確保した. 注入条件; モデル化合物として選定した農薬成分は, 一般に抽出温度 40°C, 抽出圧力 15 から 20 MPa で抽出されることから[32, 33], 注入時の温度を 40°C, 圧力を 15.0 MPa と設定した. 流量; 3.00, 4.00, 5.00 mL min^{-1} (標準設定, 5.00 mL min^{-1}), BPR 圧力; 廃棄側 BPR 圧力を注入圧力とし, カラム側 BPR 圧力は, それより低い圧力で設定可能範囲から決定した. 廃棄側 BPR 圧力(注入圧力); 15.0 MPa(70°C), カラム側 BPR 圧力; 廃棄側 BPR との差圧 5.0, 2.4, 1.2, 0.7, 0.4, 0.2, 0.1 MPa(50°C)(廃棄側 BPR 圧力 > カラム側 BPR 圧力), メイクアップポンプ流量; 0.50, 0.80, 1.00 mL min^{-1} (標準設定, 0.50 mL min^{-1}). スプリットフローによるスプリット導入後の SFC 分離は以下の条件で実施した. 廃棄側 BPR 圧力 ; 40 MPa(70°C), カラム側 BPR 圧力; 15.0 MPa(50°C), 流量; 3.00 mL min^{-1} , カラム温度; 40°C, カラム; Shim-pack UC-RP (250 × 4.6 mm i.d., 粒子径, 5 μm , 島津製作所), 移動相; 1%(W/V)ギ酸アンモニウム-メタノール溶液(溶媒 B), 勾配条件; 0% B; 0 min, 0 - 10% B; 11.0 min, 10 - 30% B; 14.0 min, 30 - 40% B; 14.1 min, 40% B; 14.1 - 17.0 min, 40 - 0% B; 17.1, 0%, 17.1 - 20.0 min. あるいは, カラム 2 本連結時は, 0% B; 0 min, 0 - 10% B; 22.0 min, 10 - 30% B; 28.0 min, 30 - 40% B; 28.1 min, 40% B; 28.1 - 34.0 min, 40 - 0% B; 34.1, 0%, 34.1 - 40.0 min とした. また, 異なるスプリット比間で, 成分と同時に流れ込む移動相量の違いに起因して保持やピーク形状などのクロマトグラムに違いが生じることが予想されたため, 成分のピーク強度が検出時の移動相環境に影響を受けにくい PDA を検出器として用いた. 検出波長: フルアジナム; 254 nm, シモキサニル; 236 nm, ピラクロホス; 264 nm, オキサミル; 240 nm, エトフェンプロックス; 225 nm, テフルベンズロン; 225 nm, クロルフルアズロン; 225 nm, イマゾスルフロン; 238 nm, シクロスルファムロン; 251 nm.

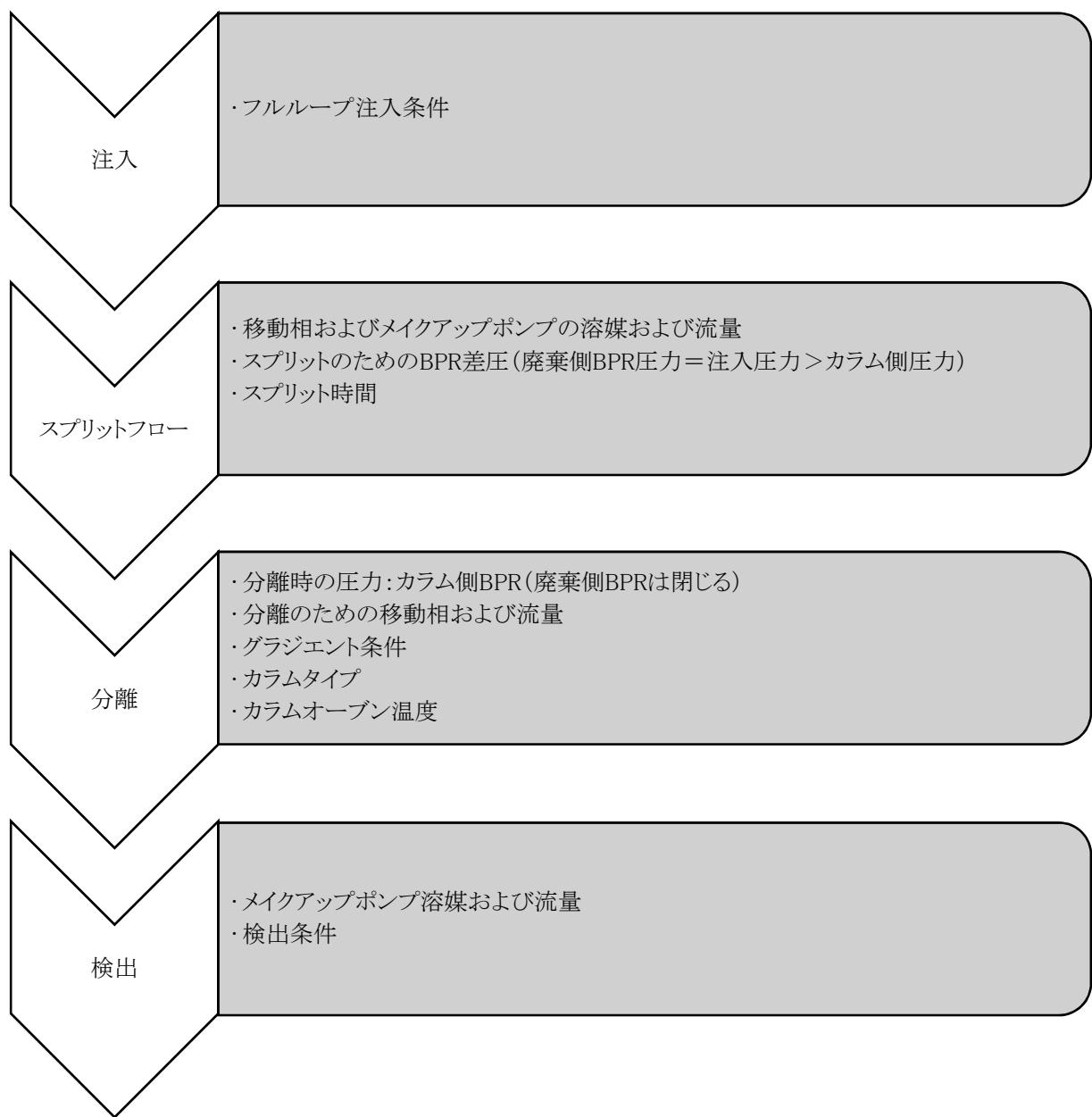


図 2-2. 分析手順と各種パラメータ.

2.2.2. 試料調製方法

農薬標準品 9 成分の混合液は、各々 $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ となるようアセトンに溶解し調製した。

フルループ注入より導入された混合液は、2 台の BPR の圧力制御により一部がカラムに導入された。スプリット挙動はカラムへの試料導入割合で示し、試料導入割合は、スプリットレス時の成分検出面積に対するスプリット時の成分検出面積割合から算出した。なお、スプリットレス導入は、廃棄側 BPR を 40.0 MPa に設定して、超臨界流体二酸化炭素が脱圧力す

ることにより生成する気泡が廃棄側 BPR から生じないことにより閉じたことを確認して実施した。

2.3. 結果および考察

2.3.1. SFC-PDA 分析条件の検討

幅広い特性の農薬 9 成分を分離するため、極性基内包型逆相固定相を分離カラム (Shim-pack UC-RP (250 × 4.6 mm i.d., 粒子径, 5 µm, 島津製作所)) として選択した。この固定相を選択した理由は、以前の我々の研究で、同じ特性のカラムが、幅広い特性の農薬成分に効果的な分離を提供したためである[34]。初めに、モディファイアの量を 10% から 40% まで約 2% min⁻¹ で増加させる条件で分離した。この条件では 10.0 min 以内にすべての成分が溶出されたが、いくつかの成分の保持時間が重なったため、モディファイアの量を 0% から 10% まで約 1% min⁻¹ で増加させ、11.0 min 内ですべての成分を溶出した後に、最終的に 40% まで増加させた。次にオートサンプラーからの注入条件を検討した。初期設定では、5,000 ng を複数回注入したときの相対標準偏差 (RSD%) すなわち注入再現性は、各成分で約 2~3% であった。この結果から、試料液と試料液吸引のためのリンス液間の空隙容量や、試料の吸引速度や吐出速度が適正でないため、導入された試料の希釀や試料への気泡の混入が生じていることが考えられた。そこで試料液とリンス液間の空隙容量を 0.1 µL から 0.5 µL へ、試料の吐出速度を 1.0 µL s⁻¹ から 0.2 µL s⁻¹ に変更したところ、注入再現性は、平均 0.3% とより高い再現性で導入することが可能となった。最後に分析方法を評価した。その結果、最適化した注入条件により、試験に用いる 9 成分を 25 - 5,000 ng の範囲において、0.9999 と非常に良い直線性と、約 1% の注入再現性で分析できた（表 2-2）。本分析法では、25 ng まで正確に検出できることから、農薬標準品を各々 5 000 ng 注入しスピリット導入した時に 0.50% のカラム試料導入割合を正確に算出できることがわかった。

表 2-2. 分析法の妥当性評価.

範囲 (ng)	25 - 5 000		
r^2 ^a	0.9999		
検出限界(ng)	12.5		
注入再現性(RSD%) ^b	1.1	1.3	0.34
	50 ng	500 ng	5 000 ng

^a 9 成分の平均値.

^b 面積値の相対標準偏差, $n = 6$.

2.3.2. BPR の差圧とカラムへのスプリット導入挙動

2 流路の BPR 差圧によりカラムへの流れを制御できると仮定し, 任意に設定した BPR 差圧におけるスプリット挙動を調査した. 試験の結果を図 2-3 と表 2-3 に示す. カラムへの試料導入割合と BPR 差圧をプロットすると, 差圧に比例して導入割合は増加した. また, 幅広い極性を持つ 9 成分は, 同じ BPR 差圧において, ほぼ同程度の試料導入割合を示した. このことは, 廃棄側よりカラム側の圧力をより低く設定することで, 流れをカラム側へ誘導でき, そのスプリット比は差圧の大きさに依存すること, またスプリットは化合物の特性に依存しないことを示している.

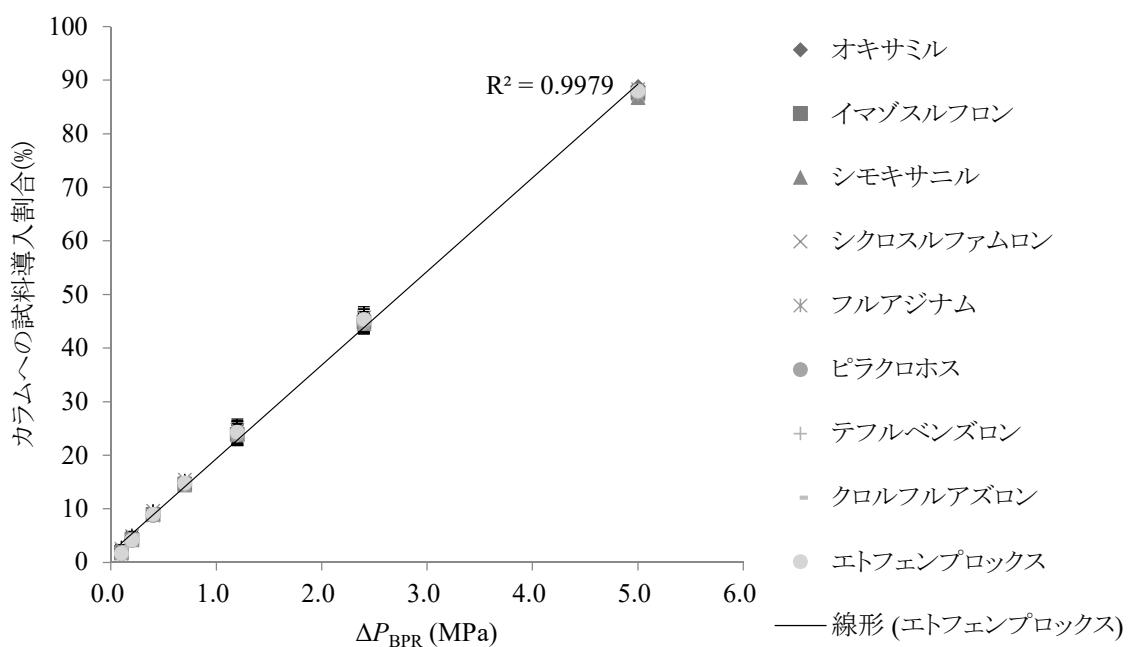


図 2-3. BPR 差圧とカラムへの試料導入割合. n=5, 平均値±標準偏差.

表 2-3. カラムへの試料導入割合と導入再現性。

成分名	BPR 圧力 (MPa) ^a	面積値			成分名	面積値		
		平均値 (μ V)	RSD%	試料導入割合(%)		平均値 (μ V)	RSD%	試料導入割合(%)
フルアジナム	スプリットレス	4 070 376	0.10	100	シモキサニル	4 372 781	0.11	100
	10.0	3 554 812	1.2	87		3 795 926	0.57	87
	12.6	1 812 090	0.73	45		1 950 834	0.80	45
	13.8	964 741	1.8	24		1 050 735	2.2	24
	14.3	588 305	1.3	14		634 039	1.6	14
	14.6	356 262	6.6	8.8		395 172	5.9	9.0
	14.8	167 146	9.6	4.1		187 367	9.1	4.3
	14.9	67 163	23	1.7		79 736	22	1.8
ピラクロホス	スプリットレス	4 782 658	0.15	100	オキサミル	2 861 956	0.28	100
	10.0	4 200 463	0.48	88		2 542 624	1.0	89
	12.6	2 142 282	0.64	45		1 292 997	0.50	45
	13.8	1 142 623	1.9	24		692 108	1.7	24

		14.3	695 998	1.3	15		428 187	0.74	15
		14.6	419 475	7.0	8.8		259 882	5.9	9.1
		14.8	197 237	9.4	4.1		127 039	7.9	4.4
		14.9	79 263	23	1.7		58 419	19	2.0
	エトフェンプロックス	スプリットレス	4 420 886	0.21	100	テフルベンズロン	4 350 747	0.12	100
		10.0	3 890 857	0.51	88		3 818 289	0.51	88
		12.6	2 007 765	0.52	45		1 940 036	0.63	45
		13.8	1 077 766	2.1	24		1 031 790	2.1	24
		14.3	655 905	1.3	15		629 683	1.3	14
		14.6	397 530	6.6	9.0		380 097	6.7	8.7
		14.8	188 145	9.1	4.3		179 008	9.8	4.1
		14.9	76 237	22	1.7		73 808	22	1.7
	クロルフルアズロン	スプリットレス	5 455 155	0.14	100	イマゾスルフロン	7 292 286	0.14	100
		10.0	4 784 307	0.42	88		6 399 121	0.51	88
		12.6	2 444 694	0.59	45		3 278 153	1.4	45
		13.8	1 336 795	2.3	25		1 745 950	1.5	24

	14.3	837 490	1.5	15		1 070 488	1.3	15
	14.6	532 164	5.6	9.8		655 442	6.0	9.0
	14.8	284 050	8.1	5.2		317 834	8.6	4.4
	14.9	158 991	14	2.6		140 905	18	1.9
シクロスルファムロン	スプリットレス	4 648 048	0.085	100	平均		0.14	100
	10.0	4 106 883	0.56	88			0.64	88
	12.6	2 125 267	0.79	46			0.73	45
	13.8	1 150 319	1.5	25			1.9	24
29	14.3	717 239	1.2	15			1.3	15
	14.6	448 861	5.5	9.7			6.2	9.1
	14.8	229 601	7.5	4.9			8.8	4.4
	14.9	117 596	16	2.9			20	2.0

^a カラム側.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 10.0-14.9 MPa(7 点), 流量: 5.00 mL min⁻¹, 移動相: 超臨界流体二酸化炭素, メイクアップポンプ流量: 0.50 mL min⁻¹, サンプリング: 0.03 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 µL (フルループ注入), n=5.

また、差圧とカラムへの試料導入割合は比例関係にあることから、(1)の関係式が成り立つ。なお、 Q_{all} はスプリット前の移動相の総流量(全流量と定義)(mL min^{-1})、 Q_{column} はカラムへスプリット導入された移動相の流量(mL min^{-1})、 a は比例定数、 ΔP_{BPR} は BPR 差圧を示す。

$$\text{カラムへの試料導入割合}(\%) = \frac{Q_{\text{column}}}{Q_{\text{all}}} 100 = a \Delta P_{\text{BPR}} \quad (1)$$

式(1)よりカラムへの試料導入割合の傾きを決定する比例定数 a は以下の式で示すことができる。

$$a = \frac{Q_{\text{column}}}{Q_{\text{all}} \Delta P_{\text{BPR}}} 100$$

流量は断面積 S と流速 u の積で表すことができるため、

$$a = \frac{S_{\text{column}} u_{\text{column}}}{Q_{\text{all}} \Delta P_{\text{BPR}}} 100 = \frac{\pi r_{\text{column}}^2 u_{\text{column}}}{Q_{\text{all}} \Delta P_{\text{BPR}}} 100$$

また流速 u は、式(2)のとおり Darcy によって移動相の粘度や、流体が流れる時に失われるエネルギーである圧力損失に関連づけられている[35]。ここで ΔP は圧力損失、 B^0 はカラムの粒子径に起因する特有の抵抗、 η は粘度、 u は流速、 L はカラム長さを示す。ここで、一般に超臨界流体は、温度、圧力によって粘度が変わるが、一定の圧力、温度条件下では粘度は変化せず、速度に無関係に一定値をとるためニュートン流体と仮定した。

$$u = \frac{\Delta P}{B^0 \eta L} \quad (2)$$

よって、比例定数 a は以下のように表すことができる。

$$a = \frac{\pi r_{\text{column}}^2 \Delta P_{\text{column}}}{Q_{\text{all}} \Delta P_{\text{BPR}} B_0^0 \eta L_{\text{column}}} \times 100$$

なお、 ΔP_{column} は、移動相がカラム側へ流れる時の圧力損失で、分岐点圧力からカラム側 BPR 圧力を差し引いたものである。一方 ΔP_{BPR} は、廃棄側 BPR 圧力からカラム側 BPR 圧力を差し引いたものである。本システムでは、分岐点から廃棄側 BPR までは太くて短い配管から構成されるため、廃棄側 BPR 圧力と分岐点圧力を同じと仮定すると、 ΔP_{column} と ΔP_{BPR} は同意となり、以下の式が導出される。

$$a \doteq \frac{\pi r_{\text{column}}^2}{Q_{\text{all}} B_0^0 \eta L_{\text{column}}} \quad (3)$$

導出された関係式より、比例定数 a は、全流量や移動相粘度、配管径や長さに影響を受けることが考えられた。またここでカラム長さは正確にはカラム側の配管と接続されたカラムの長さを指すが、カラムを接続している配管の内径は太く、抵抗がほとんどないため、接続したカラムの長さでほぼ説明できると仮定した。これら比例定数 a を構成する要素のカラムスプリット導入影響については 2.3.3 で述べた。

また、カラムへの試料導入再現性は成分面積値の相対標準偏差 (RSD%) で評価した。カラムへの試料導入再現性はカラム試料導入割合 15-100%において非常に高かった(平均 RSD% 0.94%)が、導入割合が約 15% 未満になると、再現性が低下する傾向にあった。この原因として、まず、カラム側 BPR の圧力制御精度を原因と考えた。高スプリット条件でカラムへの移動相導入量が少なくなると、カラム側 BPR の圧力制御が困難になる可能性があつた。本システムでは、分離、検出時に BPR の後ろで SCOO_2 が気化して溶解性を失う時に、成分を再溶解するためにカラム側 BPR の前に溶媒を追加導入するポンプ(マイクアップポン

ブ)を設置している。スプリット時は、マイクアップポンプの初期流量は、全く移動相がカラムへ流れ込まない状態でも BPR 壓力制御が可能と考える 0.50 mL min^{-1} に設定している。そこで、スプリット導入下のマイクアップポンプ流量を 0.50 mL min^{-1} から 0.80 mL min^{-1} , 1.00 mL min^{-1} に増加させて、カラムへのスプリット導入再現性に与える影響を検討した。その結果を表 2-4 に示す。すると予想に反して、マイクアップポンプ流量の増加は、導入再現性向上に寄与しなかった。これより、高スプリット条件で導入再現性が低下する要因は、低流量によるカラム側 BPR の圧力制御の精度低下ではないことが考えられた。ただ、当初の目的とは異なるが、マイクアップポンプ流量が高くなると、同じ BPR 差圧条件において試料導入割合が小さくなる現象が観測された。これは、マイクアップポンプ流量が増えることで、カラム側後方に背圧が発生し、結果的にカラムへの試料導入量が少なくなったことが考えられた。この結果よりマイクアップポンプ流量は、カラムスプリット導入の重要な制御要因となる可能性があることがわかった。

表 2-4. 異なるメイクアップポンプ流量条件におけるカラムへの試料導入割合と導入再現性.

成分	圧力 (MPa) ^a	0.50 mL min ⁻¹		0.80 mL min ⁻¹		1.00 mL min ⁻¹	
		試料導入 再現性 ^b	割合(%)	試料導入 再現性	割合(%)	試料導入 再現性	割合(%)
スプリット レス							
平均値		0.14	100	0.92	100	0.94	100
	10.0	0.64	88	1.5	86	1.5	84
	12.6	0.73	45	1.4	44	1.8	43
	13.8	1.9	24	3.3	23	2.1	21
	14.3	1.3	15	4.4	13	1.7	12
	14.6	6.2	9.1	6.0	6.8	4.2	5.7
	14.8	8.8	4.4	16	2.7	79	0.80
	14.9	20	2.0	-	-	-	-

^a カラム側.

^b 面積値の相対標準偏差.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 10.0-14.9 MPa(7 点), 流量: 5.00 mL min⁻¹, 移動相: 超臨界流体二酸化炭素, メイクアップポンプ流量: 0.50, 0.80, 1.00 mL min⁻¹, サンプリング: 0.03 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 μL (フルループ注入), n=5.

2.3.3. スプリットにおける分岐割合影響要素の解析

前述の式(3)に従えば, 二酸化炭素ポンプとモディファイアポンプから送液される移動相の全流量, 移動相粘度, カラムの内径や長さは, BPR 差圧とカラムへの試料導入割合に関連した式の傾きである比例定数 a に影響を与える要素と考えられる. そこでまず, 全流量と比例定数 a の関係を検討した. 全流量は, SFE による抽出や SFC 分析に典型的に利用される 3.00, 4.00, 5.00 mL min⁻¹ に設定した. 結果を図 2-4, 表 2-5, 表 2-6 に示す. いずれ

の全流量条件においても、カラムへの試料導入割合と 2 台の BPR の差圧をプロットすると、差圧に比例してカラムへの試料導入割合は増加し、その傾向は前述と同様に直線的であった。このことは、異なる全流量条件下においても、2 台の BPR の圧力を任意に設定することで、カラムスプリット導入を制御可能であることを示した。また、比例定数 a は全流量に反比例したことから、全流量は比例定数 a に関連し、その挙動は式(3)に従うことが考えられた。また、今回の試験の主旨とは異なるが、全流量が 4.00 mL min^{-1} 以下で、カラムへの試料導入割合が約 4% と高スプリット条件でも導入再現性が高くなかった。このことより、全流量 5.00 mL min^{-1} の時の高スプリット条件下の低い導入再現性は、高い流量で廃棄する時の廃棄側 BPR 壓力制御の精度に要因があることが考えられた。

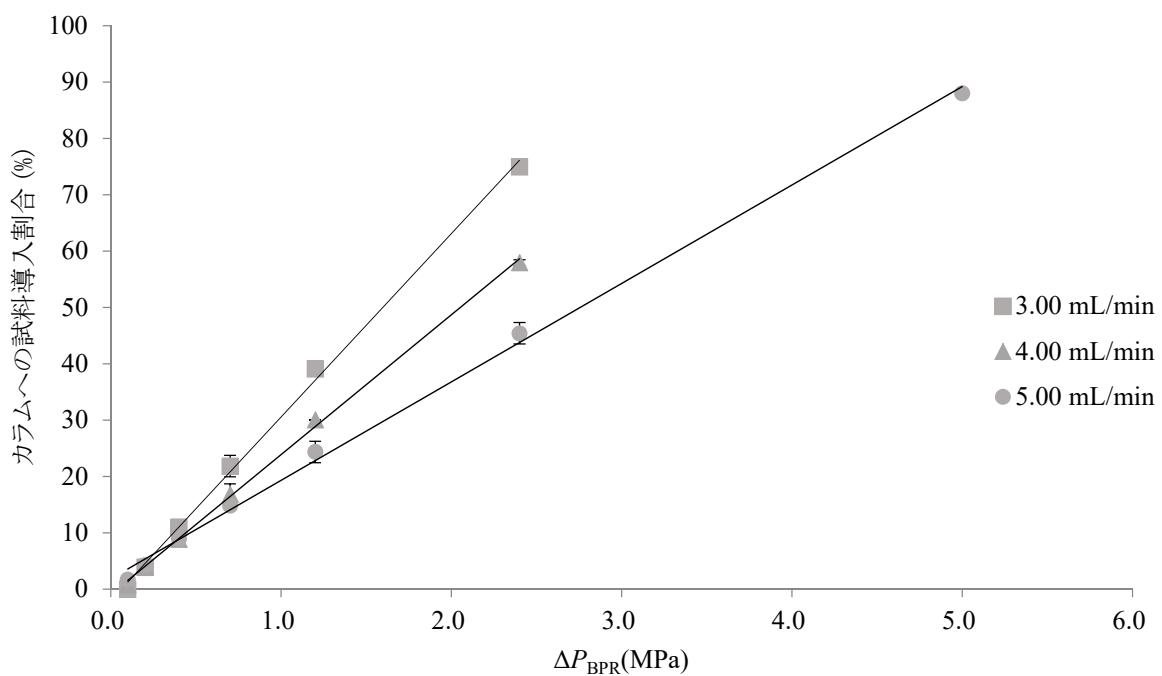


図 2-4. 異なる全流量条件における BPR 差圧とカラムへの試料導入割合(エトフェンプロップクスのみ表示). n=5, 平均値±標準偏差.

表 2-5. 異なる全流量条件におけるカラムへの試料導入割合と導入再現性.

成分	圧力 (MPa) ^a	BPR	3.00 mL min ⁻¹		4.00 mL min ⁻¹		5.00 mL min ⁻¹	
		試料導入 再現性 ^b	試料導入 割合(%)	試料導入 再現性	試料導入 割合(%)	試料導入 再現性	試料導入 割合(%)	試料導入 再現性
平均値	スプリット レス	1.2	100	0.54	100	0.14	100	
	10	-	-	-	-	0.64	88	
	12.6	1.3	75	1.2	58	0.73	45	
	13.8	0.94	39	1.3	30	1.9	24	
	14.3	0.93	22	1.7	17	1.3	15	
	14.6	1.8	11	1.1	9.0	6.2	9.1	
	14.8	6.0	4.2	2.4	4.1	8.8	4.4	
	14.9	-	-	19	1.1	20	2.0	

^a カラム側.

^b 面積値の相対標準偏差.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 10.0-14.9 MPa(7 点), 流量: 3.00, 4.00, 5.00 mL min⁻¹, 移動相: 超臨界流体二酸化炭素, メイクアップポンプ流量: 0.50 mL min⁻¹, サンプリング: 0.03 min (5.00 mL min⁻¹), 0.04 min (4.00 mL min⁻¹), and 0.05 min (3.00 mL min⁻¹), 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 µL (フルループ注入), n=5.

表 2-6. 異なる全流量条件における比例定数 *a*.

<i>Q</i> _{all} mL min ⁻¹	<i>a</i>
3.00	31
4.00	24
5.00	18

次に移動相粘度の影響を検討するため、超臨界流体二酸化炭素へ添加するモディファイア濃度のカラムスプリット導入への影響を調査した。モディファイア濃度は 0, 5, 10%に設定した。式(2)の関係から、同じ流速条件下では媒体の粘度が増加すると圧力損失が増加することが説明できるため、実際に各モディファイア濃度の媒体と同じ流速でカラムへ流した時のカラム側にかかる圧力損失を観測した。すると、カラム側圧力損失は、モディファイア濃度に依存して高くなつたことから、超臨界流体二酸化炭素へ添加するモディファイア濃度が高くなると媒体粘度が増加することを確認した(表 2-7)。このことより、式(3)に従えば、高いモディファイア濃度水準で移動相粘度 η が増加し、比例定数 a が小さくなると考えた。結果を図 2-5、表 2-8、表 2-9 に示す。モディファイア添加の影響で、ピラクロホス、オキサミルのピークが重なつたため、2 成分を除いて各試験区の平均値を算出した。いずれのモディファイア濃度条件においても、カラム導入割合と 2 台の BPR の差圧をプロットすると、差圧が小さくなるにつれ、カラムに導入される成分の割合はゼロに近似し、その様子は前述と同様に直線的であった。このことは、異なるモディファイア濃度条件下においても、2 台の BPR の圧力を任意に設定することで、カラムへのスプリット導入を制御可能であることを示唆した。また、観測された比例定数 a は、モディファイア濃度の上昇に伴い減少したことから、モディファイア濃度に起因した移動相粘度の変化は比例定数 a に関連し、その挙動は式(3)に従うことが考えられた。

表 2-7. 異なるモディファイア濃度条件におけるカラム圧力損失。

モディファイア 濃度 (%)	システム 圧力 (MPa)	カラム側 BPR 圧力 (MPa)	全量導入時の ΔP_{column} (MPa)	
0	21.4	15.0	6.4	
5	21.8	15.0	6.8	
10	22.3	15.0	7.3	

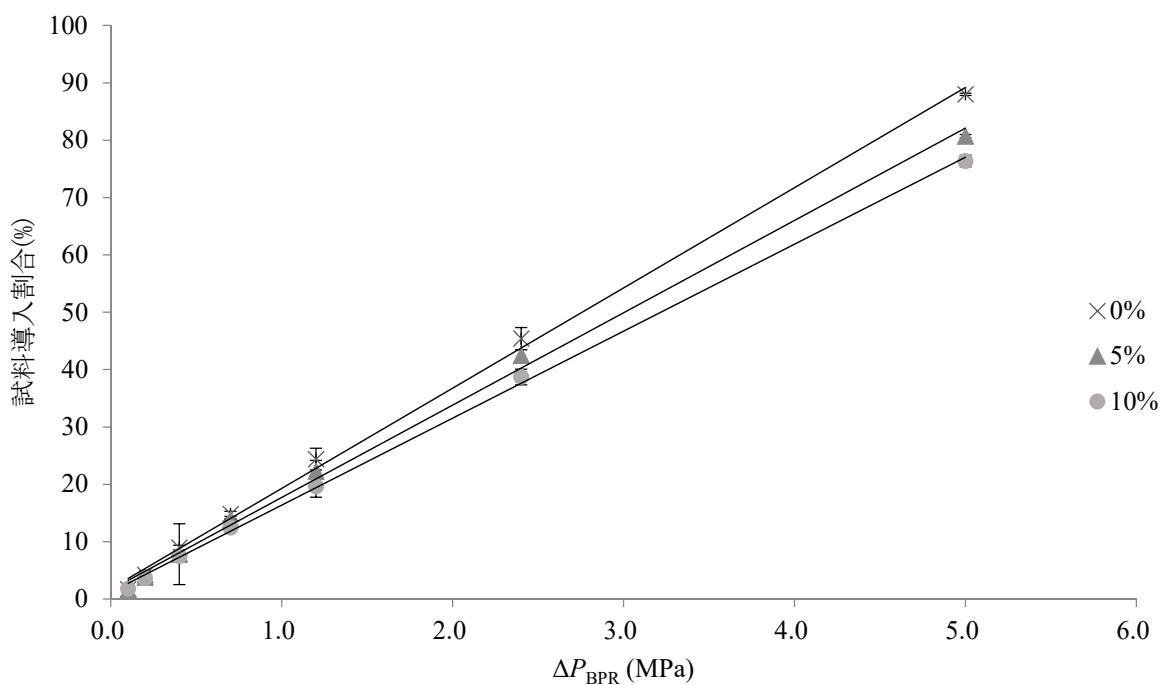


図 2-5. 異なるモディファイア濃度条件における BPR 差圧とカラムへの導入割合(エトフェンプロックのみ表示). n=5, 平均値土標準偏差.

表 2-8. 異なるモディファイア濃度条件におけるカラムへの試料導入割合と導入再現性.

成分	BPR 圧力 (MPa) ^a	0%		5%		10%	
		試料導入 再現性 ^b	試料導入 割合(%)	試料導入 再現性	試料導入 割合 (%)	試料導入 再現性	試料導入 割合(%)
平均値	スプリットレス	0.13	100	0.41	100	0.35	100
	10.0	0.61	88	0.72	80	1.7	74
	12.6	0.78	45	1.3	41	0.55	38
	13.8	1.9	24	0.55	22	1.5	19
	14.3	1.4	15	1.4	13	2.6	12
	14.6	6.1	9.1	3.6	7.6	1.4	7.3
	14.8	8.8	4.5	5.6	3.6	6.1	3.6
	14.9	20	2.0	20	1.6	7.6	1.8

^a カラム側.

^b 面積値の相対標準偏差.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 10.0-14.9 MPa(7 点), 流量: 5.00mL min⁻¹, 移動相: 100:0, 95:5, 90:10 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 %(W/V) ギ酸アンモニウム - メタノール溶液), メイクアップポンプ流量: 0.50 mL min⁻¹, サンプリング: 0.03 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 µL (フルループ注入), n=5.

表 2-9. 異なるモディファイア条件における比例定数 a .

モディファイア	
濃度 (%)	a
0	18
5	17
10	16

次に、試験に用いたカラムを 2 本連結してカラム長さを倍にし、カラム長さがカラムスプリット導入に与える影響を検討した。式(3)に従えば、カラム長さが倍になると比例定数 a は初期値の 0.5 倍になることが予想された。結果を図 2-6, 表 2-10, 表 2-11 に示す。これまでと同様にカラムへの試料導入割合と 2 台の BPR の差圧をプロットすると、差圧が小さくなるにつれ、カラムに導入される割合はゼロに近似し、その様子は直線的であった。このことは、カラム長さが異なる条件下においても、2 台の BPR の圧力を任意に設定することで、カラムへのスプリット導入を制御できることを示唆した。また、観測された比例定数 a は、カラム長さが倍になると初期値の 0.56 倍となったことから、カラム長さは、比例定数 a に関連し、その挙動は式(3)に従うことが明らかになった。

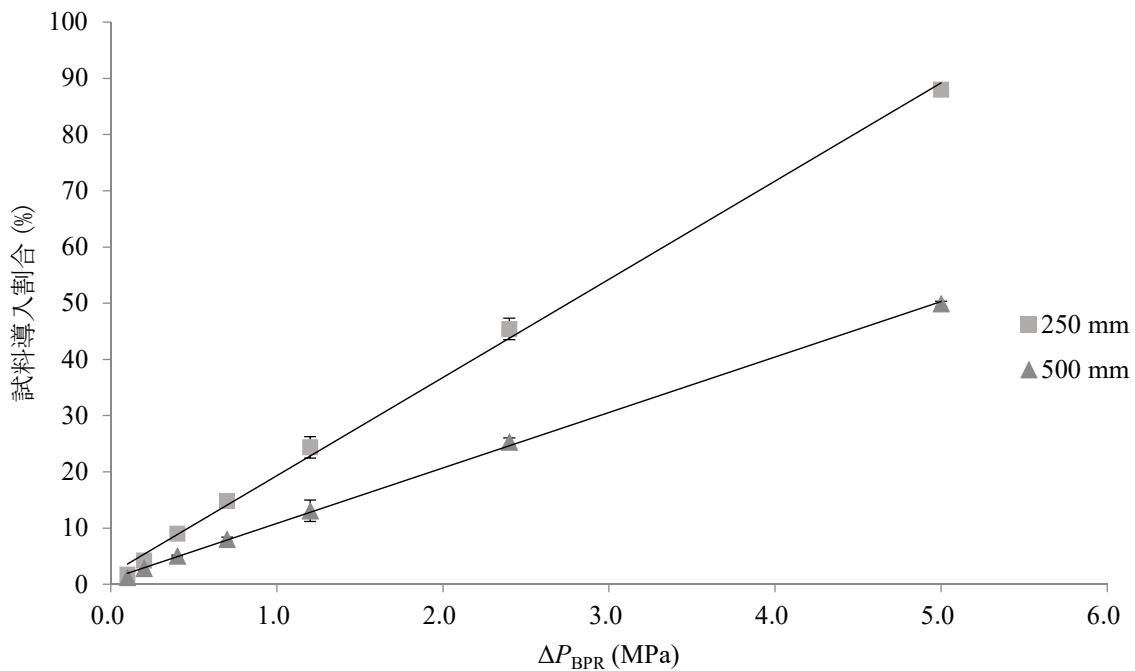


図 2-6. 異なるカラム長さ条件における BPR 差圧とカラムへの導入割合(エトフェンプロップクスのみ表示). n=5, 平均値±標準偏差.

表 2-10. 異なるカラム長さ条件におけるカラムへの試料導入割合と導入再現性.

成分	BPR 壓力 (MPa) ^a	4.6 mm I.D. × 250 mm L		4.6 mm I.D. × 500 mm L	
		試料導入 再現性 ^b	試料導入 割合 (%)	試料導入 再現性	試料導入 割合 (%)
スプリットレス		0.13	100	0.60	100
	10.0	0.61	88	1.8	49
	12.6	0.78	45	2.8	25
	13.8	1.9	24	2.8	13
平均値	14.3	1.4	15	2.0	8.0
	14.6	6.1	9.1	9.5	5.1
	14.8	8.8	4.5	9.3	3.0
	14.9	20	2.0	8.4	1.4

^a カラム側.

^b 面積値の相対標準偏差.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 10.0-14.9 MPa(7 点), 流量: 5.00 mL min⁻¹, 移動相: 超臨界流体二酸化炭素, メイクアップポンプ流量: 0.50 mL min⁻¹, サンプリング: 0.03 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 µL (フルループ注入), n=5.

表 2-11. 異なるカラム長さ条件における比例定数 *a*.

カラム長さ (mm)	<i>a</i>
250	18
500	10

2.3.4. カラムへのスプリット導入性能の検討

これまでの検討で, カラムへのスプリット導入は, 全流量 4.00 mL min⁻¹ 以下, 差圧が 0.2 MPa 以上で高い導入再現性が得られること, BPR 差圧ならびにカラム長さや移動相条件によりカラムへの試料導入割合は影響を受け, それは導出した式に従うこと, メイクアップポンプ流量により, カラムスプリット導入を制御できることを見出した. そこで, 検討したシステム構成で高スプリット条件を設定して性能を評価した. 高スプリットは, 長いカラム長さで達成されるため, カラム 2 本を接続したシステム構成で実施した. その結果流量 4.00 mL min⁻¹, 差圧 0.2 MPa, メイクアップポンプ流量 0.50 mL min⁻¹, モディファイア濃度 5%の条件において, カラム導入割合は 2.4%となった. ついで同じ条件で, メイクアップポンプ流量を 0.50 mL min⁻¹ から 0.80 mL min⁻¹ の範囲で最適化すると, メイクアップポンプ流量が 0.75 mL min⁻¹ の時に導入再現性 5%でカラムへの試料導入割合 1.5%と, 現行でスプリット導入が実用化されている GC 並みの高スプリットでの導入が可能であった(表 2-12).

表 2-12. 異なるメイクアップポンプ流量条件におけるカラムへの試料導入割合と導入再現性.

成分	メイクアップ ポンプ流量 (mL/min)	試料導入	
		再現性 ^a	割合(%)
平均値	0.50	6.5	2.4
	0.55	7.2	2.1
	0.60	3.4	2.0
	0.65	4.0	1.7
	0.70	7.4	1.6
	0.75	5.0	1.5
	0.80	14	1.6

^a面積値の相対標準偏差.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 14.8 MPa, 流量: 4.00 mL min⁻¹, 移動相: 95:5, (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム - メタノール溶液), メイクアップポンプ流量: 0.50-0.80 mL min⁻¹, サンプリング: 0.03 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 μL (フルループ注入), n=5.

2.4. 小括

以上の結果から, SFC カラム前で分岐した 2 つの流路(一方は廃棄側流路, 他方は SFC カラム側流路)に各々 BPR を設置して, 廃棄側よりカラム側の出口圧力をより低く設定することにより, 流れをカラム側へ誘導でき, そのスプリット比は差圧の大きさに依存すること, またスプリットは化合物の特性に依存しないことが示された. また, 本システムの制御要因を明らかにした. カラムへのスプリット導入は, 差圧とカラム導入割合の比例関係から導出した式と検証により, BPR の差圧の他に, 移動相条件, カラム条件に関連することが明らか

となつた。以上のことから提案したシステムにおいて高精度高スプリットとなる条件を設定した。分析カラムを 2 本連結したシステム構成で、移動相流量を 4.00 mL min^{-1} , 差圧を 0.2 MPa, モディファイア濃度 5%, メイクアップポンプ流量を 0.75 mL min^{-1} に設定した場合に、導入再現性 5.0% で試料導入割合 1.5% とハイスプリット導入が可能であった。加えてカラム側 BPR の前に設置したメイクアップポンプを用いることにより、カラムへのスプリット導入を微調整できることを発見した。メイクアップポンプから送り出される溶媒量は BPR 差圧や移動相条件、システム条件と独立した制御要因であり、柔軟なスプリット制御のためには、特筆すべき大きなメリットである。

第3章 新規スプリットフロー技術に基づく SFE-SFC システムの開発

3.1. 諸言

第1章で述べたとおり、オフラインの SFE ならびに SFC の利用が開始された 1980 年代から SFE-SFC システムの開発は検討されてきたが、抽出物の分離部への多量導入によるピーク形状の悪化やオーバーロード、測定全体の精度に関わる SFE 抽出効率の算出ができないなどの課題から未だ実用化に至っていない。第2章では、SFE 抽出物の分離部での影響を低減するインターフェイスとして、流れをカラムの前で任意に分岐させ、少量を SFC へ導入するスプリットフロー技術を開発した。そこで本章では、新規スプリットフロー技術を SFE-SFC システムに組み込み、SFE から SFC へ導入される抽出物量減少による分離改善について検証した。これに加えて、SFE 抽出物量の分離部における影響を低減させる手段として、SFC 分析カラムの前に直列にカラムを接続することを検討した。SFC は LC にない特徴として、同じ移動相条件においても、カラム固定相を選択することで多様な分離を得ることができる(16-18, 36)。また、SFC において、このような 2 つあるいはそれ以上の数のカラムを直列に接続すること(タンデムクロマトグラフィー—超臨界流体クロマトグラフィー、TC-SFC)は、高効率および多目的選択性を達成するために有効な技術とされている[37, 38]。そこで本研究では、分析カラムと対照的に目的化合物と相互作用するような固定相を分析カラムの前に接続することで、分析カラムで保持の弱い成分の選択的保持について議論した。次いで、SFE-SFC システムの潜在的課題である SFE 抽出効率の算出について検討した。第1章で述べたように、抽出効率は、抽出工程を介さずに得られた標準物質(標準)と抽出工程を介して得られた標準添加試料(添加試料)の任意の量を比較することで算出できる。しかしながら、両者の SFC に注入される溶媒や溶媒量、および注入バンド幅などの注入条件とマトリクス条件の違いにより、2 つのモードの測定値の正確な比較ができないという課題があった。よって現状としては、時間のかかる装置変更によって、両者をオフラインモードで測定する手法がとられている。また、オンラインモードで抽出効率を算出する場合もある

が、その時の抽出効率は、同一の試料を同じ測定条件で目的化合物の検出がなくなるまで複数回測定して、その合計成分面積に対する測定 1 回目の成分面積の割合から求めるため、非常に時間がかかるという欠点があった。そこで標準を、陰性試料の抽出中にインジェクターから注入し、注入バンド幅を SFE に匹敵するバンド幅に物理的に拡張して導入することにより、両者の注入条件ならびにマトリクス条件を同一化することを検討した。

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. 試薬および装置

全章と同様に、ギ酸アンモニウム(99.9%グレード)およびメタノール(LC-MS グレード)は、シグマアルドリッヂ社(米国、ミズーリ州、セントルイス)から購入した。SFE-SFC システム構築のための 9 つの農薬標準品フルアジナム、シモキサニル、ピラクロホス、オキサミル、エトフェンプロックス、テフルベンズロン、クロルフルアズロン、イマゾスルフロン、シクロスルファムロンとアセトン(残留農薬およびポリ塩化ビフェニル分析用)は、和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した。液化 二酸化炭素(99.9%グレード、日本、宮崎、宮崎酸素株式会社)を SFC 移動相として使用した。また実試料による分析システムの評価には林純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した農薬標準品プロポキスル、ピリミカルブ、マクバール、メチオカルブ、ホキシム、ベンスリド、ベンフラカルブ、トリフルミジール、カルボスルファンを用いた(表 3-1)。

表 3-1. 実試料による SFE-SFC システム評価のために選択した農薬標準品.

	成分名	分子式	質量	$\log P_{ow}^a$	備考
1	プロポキスル	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	209.24	0.14	
2	ピリミカルブ	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238.39	1.7	
3	マクバール	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179.22	2.23	
4	メチオカルブ	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	225.31	3.18	
5	ホキシム	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	298.3	3.38	易光分解
6	ベンスリド	C ₁₄ H ₂₄ NO ₄ PS ₃	397.51	4.2	易光分解
7	ベンフラカルブ	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S	410.53	4.22	
8	トリフルミゾール	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	345.75	4.77	
9	カルボスルファン	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	380.5	7.42	

^a 極性.

図 3-1 に試験に用いたプロトタイプ SFE-SFC/MS(PDA)((株)島津製作所製)を示す. 2 つの送液ポンプ(LC-30AD), 2 つの六方バルブ(島津製作所製), 抽出チャンバー(SFE-30A), オートサンプラー(SIL-30AC), 2 台の BPR(SFC-30A), カラム, メイクアップポンプ(LC-30AD), カラムオーブン(CTO-20AC), PDA(SPD-M20), MS(LCMS8040), 装置制御およびデータ解析のためのソフトウェア LabSolution(バージョン 1.5.1)を備えた装置を試験に用いた. またオフライン SFE は, 上記構成から 1 台の BPR, カラム及び検出器を除いた構成とし, BPR から排出された試料は, 蓋に穴を 2 か所開けた 20 mL 試験管に回収した. 抽出には 5 mL 容量の抽出管を用いた. 測定は図 3-1 および図 3-2 に示すスキームのとおり実施した. オートサンプラーから試料を注入する場合, 試料は 2 台の BPR の差圧およびメイクアップポンプ流量によって, その一部がカラムに導入される. 試料導入終了後に廃棄側 BPR を閉じ, 移動相をカラムへ流入させることで, カラムの先端に捕捉された成分は分離, 検出された. SFE から試料を注入する場合, 抽出物はスタティック抽出を経て, ダイナミック抽出で連続的に分離部へ転送され, スプリットフローによりその一部がカラムに導入

される。抽出時間が終了して上流のバルブが抽出から測定の位置に変わると、これまで抽出管を介して流れていた媒体が、下流のバルブに直接流れ込む。抽出終了直後は下流のバルブからスプリット点にかけて試料が残存していることが考えられたため、抽出が終了し上流のバルブが測定の位置に変わってからも、配管容量を考慮して媒体を流しながらスプリットした。スプリット導入終了後にカラムに捕捉された成分は前述と同様に分離・検出した。SFEにおける抽出溶媒と抽出時間の検討は、SFEとMSを直接接続して抽出状況をモニタリングして評価した。廃棄側BPRを閉じた状態にして、カラム側BPRを抽出圧力とした。また、SFEの抽出効率の算出は、SFE-SFC/MSを用い、陰性試料抽出工程中にオートサンプラーから注入した標準とSFEから注入した添加試料の値を比較することで行った。

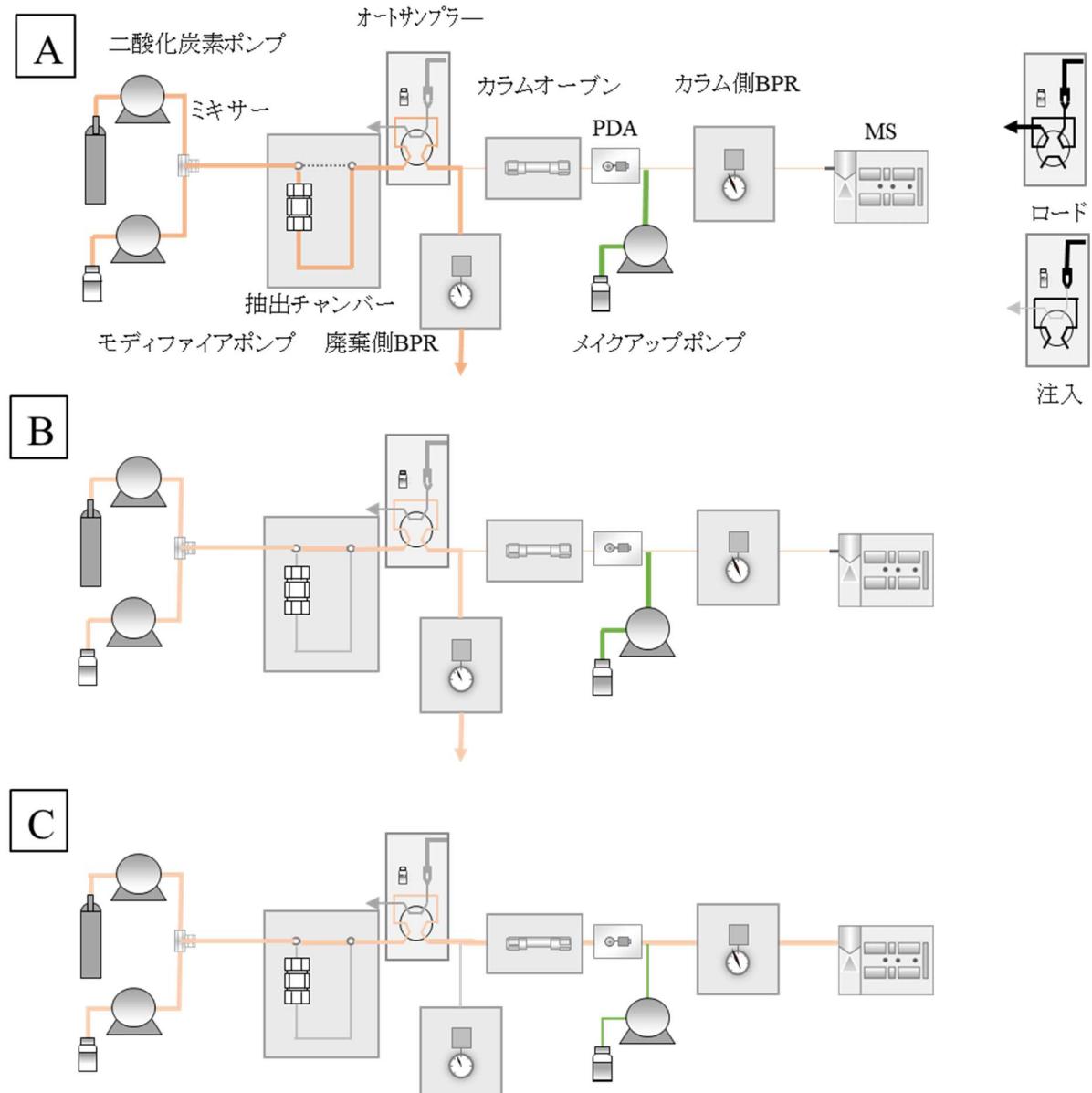


図 3-1. SFE-SFC-MS (PDA) システムの概要.

(A) 抽出とスプリットフロー, (B) 抽出終了後スプリットフロー, (C) 分離および検出.



図 3-2. SFE-SFC における分析手順と各種パラメータ.

3.2.2. 試料調製方法

SFC-PDA を用いたスプリットフロー条件検討には、農薬混合液が各々 $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ となるようアセトンに溶解したものを試料とした。SFE-MS あるいは SFE-SFC/MS、オフライン SFE を用いた評価には、脱水剤 1.0 g に、農薬混合液 10 mg L^{-1} (アセトン溶解)を $10 \mu\text{L}$ 添加して 30 min 間放置し、混合後に 5 mL 容抽出管へ封入したものを試料とした。実試料を用いた SFE-SFC システムの評価には、脱水剤 1.0 g に、農薬混合液 0.10 mg L^{-1} (アセトン溶解)を $10 \mu\text{L}$ 添加して 30 min 間放置した粉碎試料を混合し、 5 mL 容抽出管へ封入したものを試料とした。なお、これで試料中農薬成分の濃度は 0.010 ppm(mg/kg) となる。

3.2.3. オートサンプラーおよび SFE からの試料注入条件

オートサンプラーからの試料注入は以下の条件で実施した。スプリットフロー条件検討においては、注入方法：フルループ注入：5.0 μL ；エアギャップ量：0.5 μL ；吸引速度：5.0 $\mu\text{L s}^{-1}$ ；吐出速度：0.2 $\mu\text{L s}^{-1}$ ；プレロード容量：15.0 μL で実施した。SFE 抽出効率算出検討においては、注入方法：パーシャルループ注入：2.0 μL ；エアギャップ量：0.1 μL ；吸引速度：5.0 $\mu\text{L s}^{-1}$ ；吐出速度：1.0 $\mu\text{L s}^{-1}$ 。SFE からの試料注入は以下の条件で実施した。抽出方法：スタティック及びダイナミック抽出、抽出終了後スプリット；抽出温度：40°C。その他の条件は、テキストや図の注釈に示した。

3.2.4. スプリットフロー条件

第 2 章のとおり、スプリットフローによるカラムへのスプリット導入は、2 台の BPR の差圧および移動相条件やカラム条件により決定することができ、さらにメイクアップポンプ流量で高度に制御できる。本システムでは、構造上抽出圧力は廃棄側 BPR 圧力に近似するため、まず廃棄側 BPR の圧力を抽出圧力として 15.0 MPa に固定し、これに対するカラム側 BPR の圧力を低く設定することで試料をスプリットして SFC カラムに導入した。最適な導入差圧を決定した後に、メイクアップポンプ流量を調節することにより最小導入量を決定した。他の条件はテキストや図下の注釈に示した。スプリット挙動は第 2 章と同様に、カラムへの試料導入割合で示し、導入割合は、スプリットレス時の成分検出面積を 100 とした時のスプリット時の成分検出面積から算出した。スプリットレス導入は、廃棄側 BPR を完全に閉じて、超臨界流体二酸化炭素が脱圧力することにより生成する気泡が廃棄側 BPR から生じないことにより確認した。なお、異なるスプリット比間で、成分と同時に流れ込む移動相量の違いに起因して保持やピーク形状などのクロマトグラムに違いが生じることが予想されたため、成分のピーク強度が検出時の移動相環境に影響を受けにくい PDA (SPD-M20) を検出器として用いた。新規スプリットフロー技術を組み込んだ SFE-SFC/MS におけるスプリットの効果検証では、検出強度の飽和を考慮して、差圧を 0.7, 0.4, 0.2 MPa (それぞれ 17%, 9.0%, 2.7% の試料導入割合に対応) に設定した。

3.2.5. SFC-PDA および SFC/MS の分析条件

スプリットフローによるカラムスプリット導入後の SFC 分離は以下の条件で実施した。廃棄側 BPR: 40.0 MPa(70°C); カラム側 BPR: 15.0 MPa(50°C); 流量: 3.00 mL min⁻¹; カラムオーブン温度: 40°C; 順相カラム: Inertsil Diol(4.6 × 50 mm, GL サイエンス), Inertsil NH2(4.6 × 50 mm, GL サイエンス), Inertsil CN-3(4.6 × 50 mm, GL サイエンス), Inertsil SIL-100A(4.6 × 50 mm, GL サイエンス); 分析カラム: Shim-pack UC-RP (250 × 4.6 mm i.d., 粒子径, 5 μm, 島津製作所); 移動相: 超臨界流体二酸化炭素(溶媒 A)および 0.1%(W/V)ギ酸アンモニウム-メタノール溶液(溶媒 B); 勾配条件: 0% B; 0 min, 0-10% B; 11.0 min, 10-30% B; 14.0 min, 30-40% B; 14.1 min, 40% B; 14.1-17.0 min, 40 - 0% B; 17.1, 0% B; 17.1-20.0 min; メイクアップポンプ溶液: 0.1%(W/V)ギ酸アンモニウム-メタノール溶液; メイクアップポンプ流量: 0.10 mL min⁻¹; PDA による検出条件は以下のとおり。波長: フルアジナム, 254 nm; シモキサニル, 236 nm; ピラクロホス, 264 nm; オキサミル, 240 nm; エトフェンプロックス, 225 nm; テフルベンズロン, 225 nm; クロルフルアズロン, 225 nm; イマゾスルフロン, 238 nm; シクロスルファムロン, 251 nm. MS による分析は次に示す条件の下, 三連四重極質量分析計(LCMS8040; 島津製作所, 京都)により実施した。イオン化法: ポジ, ネガモードのエレクトロスプレーイオン化法(ESI), インターフェイス電圧: 4.50 kV, ESI (+), -3.50 kV, ESI (-), ネブライザー流量: 3 L min⁻¹, ドライリングガス流量: 15 L min⁻¹, 脱溶媒温度: 250°C, ヒートブロック温度: 400°C.

3.2.6. SFE-SFC/MS を用いた実サンプル分析条件

開発した SFE-SFC システムの実用性を評価するため, 幅広い極性を持つ農薬成分ならびに光分解しやすい農薬成分を添加した試料を分析し, 厚生労働省残留農薬等試験法の妥当性評価ガイドラインを参照して評価した。目標とする基準値は, 厚生労働省食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン[39]を参考に設定した(表 3-2).

表 3-2. 目標とする基準値.

項 目	基 準
選択性	保持時間付近に定量を妨げる妨害ピークが存在しないこと
平行精度 (%RSD) (n=5 以上)	0.001 < ~ ≤ 0.01 ppm: 25 >

3.3. 結果および考察

3.3.1. SFC/MS 分析条件の検討

新規スプリットフローを導入した SFE-SFC/MS による幅広い極性の化合物への適応可能性を検証するため、第 2 章で用いた農薬 9 成分を用いた。本システムでは、SFC から大気圧の MS へ移行する過程での超臨界流体二酸化炭素気化による成分分析出の回避や、質量分析のイオン化効率向上のために、カラムの後ろに設置したマイクアップポンプから有機溶媒を添加した。マイクアップポンプ流量が高い場合に、分離した成分が希釈されてしまうことが予想されたため、0.05, 0.10, 0.20 mL min⁻¹ の 3 水準で検討した。その結果、流量が最も低い条件では、グラジエント分析中に移動相の有機溶媒濃度が低い時に溶出する化合物のピーク形状が不良となり、流量が高い条件では、グラジエント分析中に移動相の有機溶媒濃度が高い時に溶出する化合物が希釈され、それら化合物の感度が低下した。したがって、マイクアップポンプ流量は、グラジエント分析において有機溶媒濃度が高い時にある程度の感度を保ち、移動相の有機溶媒濃度が低い時に溶出する化合物のピーク形状が良好であった 0.10 mL min⁻¹とした(図 3-3)。9 成分の多重反応モニタリング(Multiple reaction monitoring, MRM)の最適化は、実際の SFC/MS 測定と検出環境を合わせるため、フローインジェクションにより行った(表 3-3)。最後に、最適化した分析法を評価した。検出限界および定量限界は、シグナルとノイズの比が 3 あるいは 10 以上となる量とし、検量線の直線性は、定量限界を含む 6 点で算出した。その結果、表 3-4 に示すように 2.5-12.5 pg の定量限

界となり、検量線は 0.995-1.000 と直線性は良好で、面積値の相対標準偏差 (RSD%) は

2.3-8.7 の再現性で分析可能であった。

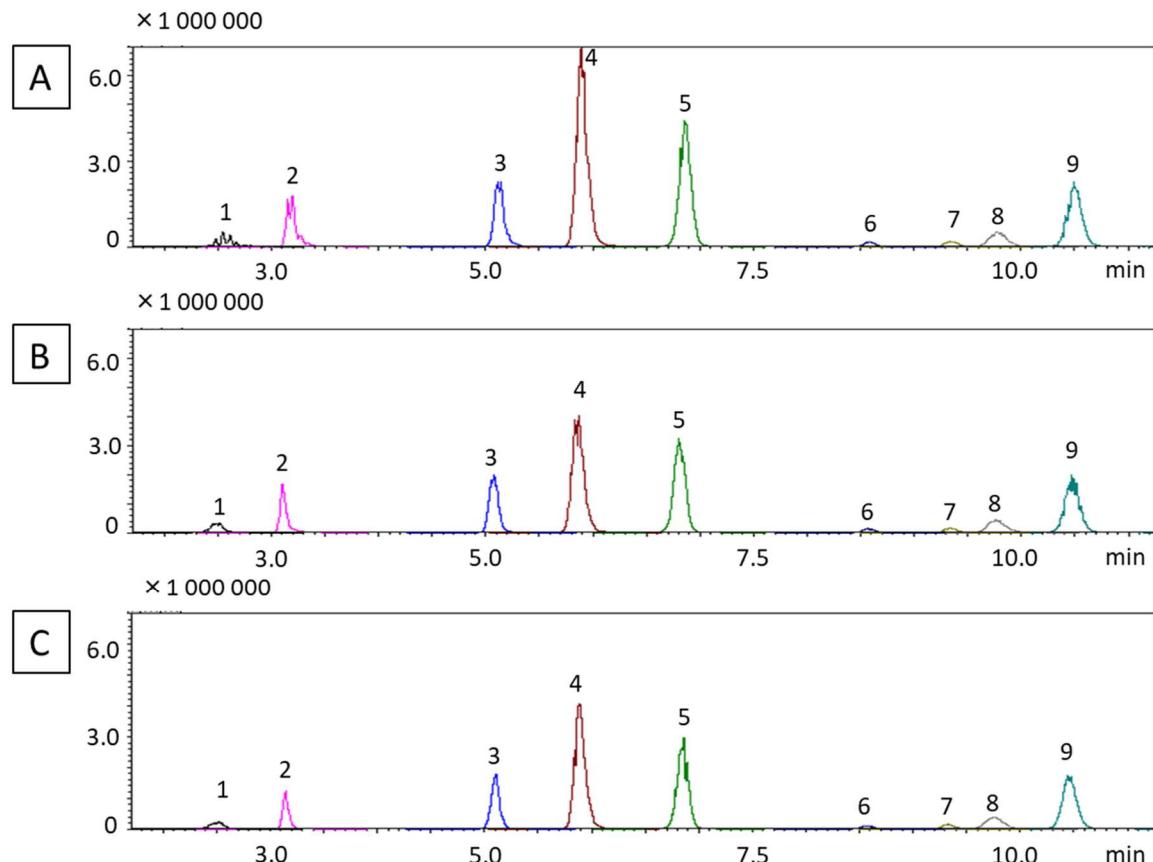


図 3-3. 異なるメイクアップポンプ流量条件における 9 成分混合標準品の MRM クロマトグラム。

(A) メイクアップポンプ流量 0.05 mL min^{-1} ; (B) メイクアップポンプ流量 0.10 mL min^{-1} ; (C) メイクアップポンプ流量 0.20 mL min^{-1} , (1)シモキサニル, (2) フルアジナム, (3)ピラクロホス, (4) オキサミル, (5) エトフェンプロックス, (6) テフルベンズロン, (7) クロルフルアズロン, (8) イマゾスルフロン, (9) シクロスルファムロン。

表 3-3. 試験に用いた化合物の MRM パラメータ。

成分名	選択	プリカーサー	プロダクト	Q1 プレロット ^a	コリジョン	Q3 プレロット ^a	
	イオン	イオン	イオン	バイアス	エネルギー	バイアス	
		[m/z]	[m/z]	[V]	[V]	[V]	
オキサミル		[M+NH ₄] ⁺	237.2	71.8	-10	-14	-13
イマゾスルフロン		[M+H] ⁺	413.1	152.7	-11	-13	-15
シモキサニル		[M+H] ⁺	199	128	-13	-9	-12
シクロスルファムロン		[M+H] ⁺	422.2	260.7	-11	-17	-27
フルアジナム		[M-H] ⁻	463.1	416	16	18	27
ピラクロホス		[M+H] ⁺	361.1	256.7	-12	-23	-28
テフルベンズロン		[M+H] ⁺	381	158	-15	-23	-24
クロルフルアズロン		[M+H] ⁺	540.1	382.5	-20	-18	-26
エトフェンプロックス		[M+NH ₄] ⁺	394.4	176.7	-10	-14	-18

表 3-4. 試験に用いた成分の SFC/MS 分析性能。

成分名	保持 時間 [min]	RSD [%] (n = 5) ^a		直線性 r^2	範囲 [pg]	検出 限界 [pg]	定量 限界 [pg]
		保持 時間	面積				
オキサミル	5.9	0.35	7.9	0.999	2.5 – 125	0.5	2.5
イマゾスルフロン	9.8	0.31	3.5	0.997	5.0 - 250	2.5	5.0
シモキサニル	3.2	0.99	4.9	0.995	2.5 - 125	1.25	2.5
シクロスルファムロン	10.5	0.21	5.8	1.000	2.5 - 125	0.5	2.5
フルアジナム	2.5	0.65	8.7	0.999	12.5 - 500	5.0	12.5
ピラクロホス	5.1	0.38	5.0	0.999	2.5 - 125	0.5	2.5
テフルベンズロン	8.6	0.19	6.7	0.999	5.0 - 250	2.5	5.0
クロルフルアズロン	9.4	0.15	2.3	0.999	5.0 - 250	1.25	5.0
エトフェンプロックス	6.9	0.28	6.3	0.999	2.5 - 125	0.5	2.5

注入: 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 125, 250, 500, 5000 pg 5 μL⁻¹ (フルループ注入).

^a 50 pg, n=5.

3.3.2. SFE 抽出条件の検討

実際の SFE のための試料調製は、試料由来の水分が BPR 出口で凍つて装置を詰まるのを防ぐために、試料と脱水剤を混和して行われる[2]. よって本試験においても、実際

の処理に合わせて脱水剤に標準混合液を添加したものを試料として用いた。まず、試料から成分を効率良く抽出するため、抽出溶媒と抽出時間を検討した。抽出はスタティック抽出を 2.5 min (5 mL 容積抽出管を抽出媒体で満たした後、少しオーバーフローする条件) とし、ダイナミック抽出は、MS で抽出の様子をモニタリングしたときに、すべての成分が試料から溶出する時間とした。また抽出溶媒は、超臨界流体二酸化炭素 : 0.1%(W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液を 100: 0, 95: 5, 90: 10, 85: 15(V/V) と SFE 抽出で比較的よく用いられる濃度範囲である 1~10% [40] を含む範囲で検討した。その結果、超臨界流体二酸化炭素へのモディファイア 5% 添加により、成分の試料からの溶出が早くなる傾向があつたが、10 あるいは 15 % では逆に溶出が遅くなったため、モディファイア濃度を 5% に決定した(図 3-4)。また抽出時間は、全ての成分の溶出が確認できたスタティック抽出 2.5 min、ダイナミック抽出 7.5 min の総抽出時間 10.0 min とした。

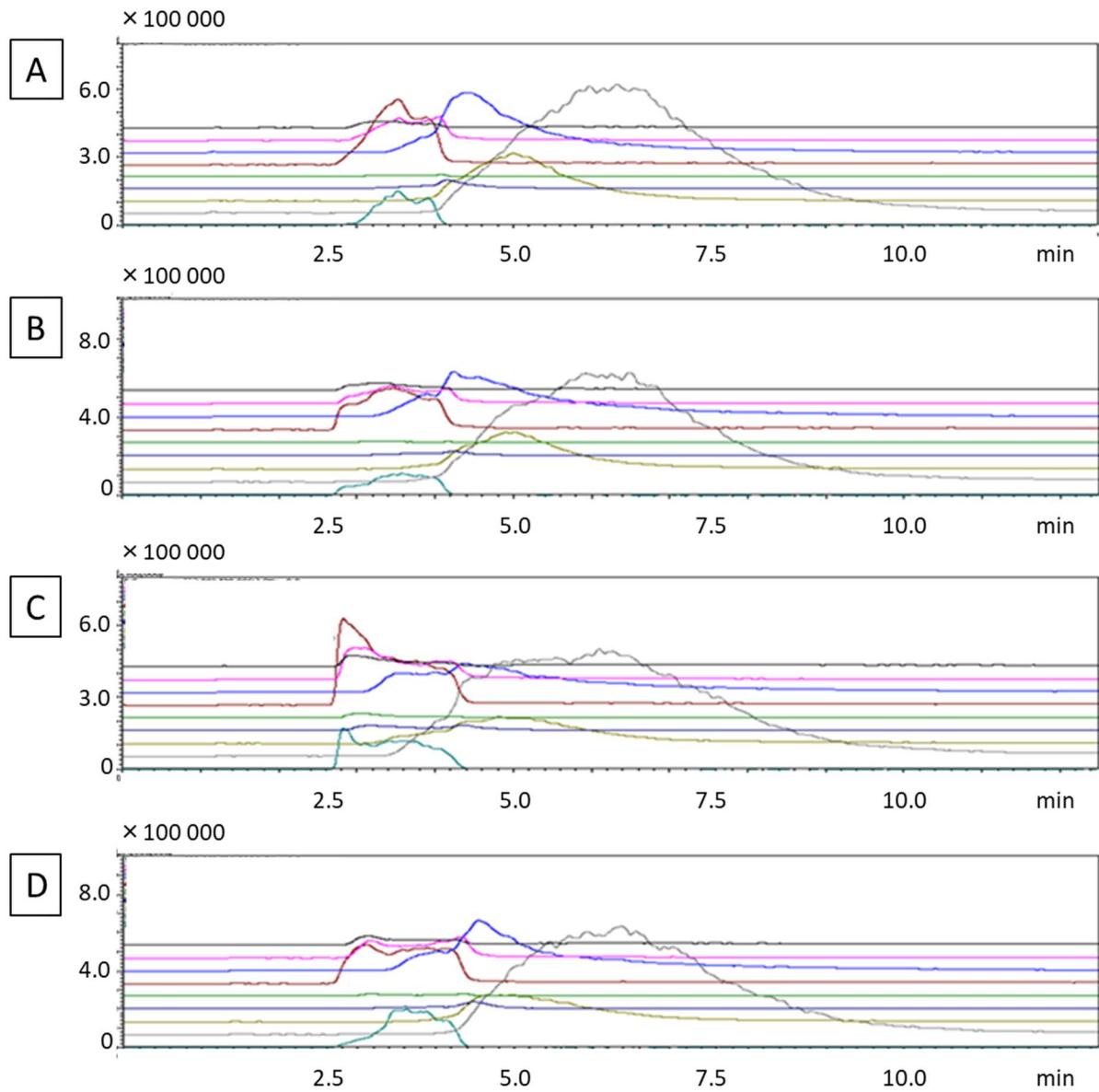


図 3-4. 異なる抽出溶媒条件における 9 成分混合標準品の抽出挙動.

抽出法: スタティック 2.5 min, ダイナミック 10.0 min, 抽出溶剤: (A) 100: 0, (B) 95: 5, (C) 90: 10, (D) 85:

15(V/V)(超臨界流体二酸化炭素: 0.1 %(W/V)ギ酸アンモニウム-メタノール溶液, 抽出流量: 4.00 mL min⁻¹,

廃棄側 BPR: 40.0 MPa, カラム側 BPR: 15.0 MPa, メイクアップポンプ溶媒: 0.1 %(W/V)ギ酸アンモニウム-メタ

ノール溶液, メイクアップポンプ流量: 0.10 mL min⁻¹. 各 MRM クロマトグラムのシフトしたベースライン上から

(1)シモキサニル, (2)ピラクロホス, (3)オキサミル, (4)エトフェンプロックス, (5)テフルベンズロン, (6)クロルフルア
ズロン, (7)イマゾスルフロン, (8)シクロスルファムロン, (9)フルアジナム.

3.3.3. スプリットフローの条件検討

本研究では、SFE からの抽出物の分離部への導入量を大幅に削減することを目的とするため、最小導入条件を検討した。その結果を表 3-5 および表 3-6 に示す。その結果差圧が小さくなる程カラムへの試料導入割合が小さくなり、高い導入再現性が得られる最も低い差圧は 0.2 MPa となった。差圧を 0.2 MPa に固定してマイクアップ流量を上げると、試料導入割合をさらに少なくすることができた。差圧が 0.2 MPa、マイクアップポンプ流量 0.65 mL min⁻¹ の時に、試料導入再現性は 5.0% 以内で、導入割合は 2.7% となった。これらの結果より、SFE-SFC/MS に適用する高スプリット条件は、BPR 差圧 0.2 MPa、マイクアップポンプ流量 0.65 mL min⁻¹ とした。

表 3-5. 試験に用いた成分のカラム導入割合および導入再現性の平均値。

廃棄側 BPR 圧力 (MPa)	カラム側 BPR 圧力 (MPa)	試料導入 再現性 ^a	試料導入 割合(%)
15.0	スプリットレス	0.54	100
	12.6	1.2	58
	13.8	1.3	30
	14.3	1.7	17
	14.6	1.1	9.0
	14.8	2.3	3.7

^a 面積値の相対標準偏差。

流量: 4.00 mL min⁻¹, 移動相: 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 1 %(W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液),
 マイクアップポンプ流量: 0.50 mL min⁻¹, サンプリング: 0.04 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 μL (フルループ注入),
 n=5.

表 3-6. 異なるメイクアップポンプ流量条件における試験に用いた成分のカラム導入割合および導入再現性の平均値.

ΔP_{BPR} (MPa)	メイクアップ ポンプ流量 (mL min ⁻¹)	試料導入 再現性 ^a	試料導入 割合 (%)
0.2	0.50	2.3	3.7
	0.55	6.7	3.4
	0.60	4.9	3.1
	0.65	4.9	2.7
	0.70	14	2.3
	0.75	5.0	2.2
	0.80	5.0	2.0

^a 面積値の相対標準偏差.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 14.8 MPa, 流量: 4.00 mL min⁻¹, 移動相: 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液), メイクアップポンプ流量: 0.50-0.80 mL min⁻¹, サンプリング: 0.04 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 μL (フルループ注入), n=5.

3.3.4. 新規スプリットフロー技術を統合した SFE-SFC/MS による抽出物部分導入と SFC における分離挙動

次に, 新規スプリットフロー技術を組み込んだ SFE-SFC/MS において, スプリットフローにより SFE からの抽出物量を変更して SFC カラム導入した時の分離に与える影響を検討した. 全ての試験区は, 同一の抽出および分析条件であるため, 得られた結果は単純に SFC への抽出物導入量の影響を反映したものである. 結果を図 3-5 と表 3-7 に示す. 化合物ごとに抽出物導入量に応じた半値幅や保持係数の変化が観測された. まず分析カラムに強く保持される化合物, すなわち, テフルベンズロン, クロルフルアズロン, イマゾスルフロン, およびシクロスルファムロンは, カラムへの抽出物導入量が減少するにつれて, 半値幅は狭く, 保持係数は大きくなつたが, その変化はわずかであった. また, 分析カラムに中間的に保持される化合物, すなわちピラクロホス, オキサミル, エトフェンプロックスは, 抽出物の導入量

が減少するにつれて、半値幅は狭く、保持係数は大きくなり、その変化は顕著であった。一方、分析カラムに弱く保持される化合物、すなわちシモキサニルとフルアジナムは、カラムへの抽出溶剤導入量減少によって半値幅に一定の変化はなかったが、保持係数は大きくなつた。この結果は、分析カラムに強く保持される化合物、すなわち、テフルベンズロン、クロルフルアズロン、イマゾスルフロン、およびシクロスルファムロンは、抽出溶剤よりもカラム固定相とより強く相互作用するため、抽出中のカラム先端での捕捉が良好となり、抽出溶剤の導入量に影響を受けにくいことが考えられた。一方分析カラムで比較的保持が弱い化合物、すなわち、シモキサニル、フルアジナム、ピラクロホス、オキサミルは、カラム固定相よりも抽出溶剤とより強く相互作用するため、カラム先端での成分捕捉が弱く、ピーク形状や保持が抽出溶剤導入量に応じて大幅に変化することが考えられた。従ってスプリットフローによって SFC カラムへの抽出物導入量を減少させることで、分析カラムで保持が弱い成分の、抽出中のカラム先端捕捉を良好にし、結果的に分離を改善できると結論付けた。ただし、高スプリット条件 ($\Delta P = 0.2 \text{ MPa}$) であっても、分析カラムで保持が弱い成分のうちシモキサニルおよびフルアジナムの保持係数は、オフライン SFC においてインジェクターから $5.0 \mu\text{L}$ 注入したときに観察された保持係数よりも小さかった。これは、オンラインシステムとオフラインシステムのカラムへ流れ込む溶剤の絶対的な量の違いによるものと考えられた。また、前述のとおり、分析カラムで比較的保持の弱い成分は、抽出溶剤導入量の影響を受けやすい。よって、さらに実用的なシステムとするためには、スプリットフロー技術に加えて、分析カラムで保持が弱い成分の選択的保持技術の提案が必要と考えた。

表 3-7. 異なる抽出物カラム導入量における分離性能..

成分名	$\Delta P^a = 0.7 \text{ MPa}$			$\Delta P = 0.4 \text{ MPa}$			$\Delta P = 0.2 \text{ MPa}$			オンライン SFC ^d		
	K ^b	W ₅₀ ^c	シンメトリ 係数	K	W ₅₀	シンメトリ 係数	K	W ₅₀	シンメトリ 係数	K	W ₅₀	シンメトリ 係数
				-	-	-	-	-	-	-	-	-
フルアジナム	< 0	0.158	0.95	0.8	0.090	1.08	2.3	0.148	1.27	4.8	0.065	1.53
シモキサニル	< 0	0.133	1.05	1.0	0.063	1.14	2.3	0.137	1.23	3.7	0.125	0.98
ピラクロホス	3.9	0.582	-	7.1	0.129	1.23	8.2	0.102	1.12	8.2	0.098	1.17
オキサミル	6.4	0.477	1.34	8.4	0.199	2.30	9.7	0.116	1.17	9.7	0.121	1.19
エトフェンプロックス	9.1	0.173	1.06	10.4	0.126	1.08	11.3	0.115	1.07	11.5	0.124	1.01
テフルベンズロン	13.3	0.139	1.12	14.0	0.123	1.11	14.5	0.119	1.03	14.5	0.125	0.99
クロルフルアズロン	14.7	0.135	1.11	15.4	0.124	1.08	15.8	0.126	1.04	16.0	0.140	1.07
イマゾスルフロン	15.6	0.156	1.46	16.2	0.142	1.31	16.5	0.142	1.29	16.7	0.182	1.15
シクロスルファムロン	17.1	0.154	1.33	17.6	0.144	1.19	17.8	0.132	1.12	18.0	0.162	1.12

^a 廃棄側 BPR 圧力からカラム側 BPR 圧力を差し引いた差圧.^b 保持係数(空隙率 0.4).^c 半値幅.^d 注入: 1.0 mg L⁻¹, 5.0 μL (フルループ注入, アセトン).

抽出法: スタティック 2.5 min, ダイナミック 7.5 min, 抽出終了後のスプリット: 1.0 min(5%モディファイア), 0.5 min(超臨界流体二酸化炭素).抽出溶剤: 95:5 (超臨界流体二酸化炭素:0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液, 抽出流量: 4.00 mL min⁻¹, 廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 14.3, 14.6, 14.8 MPa, メイクアップポンプ溶媒: 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液, メイクアップポンプ流量: 0.65 mL min⁻¹.

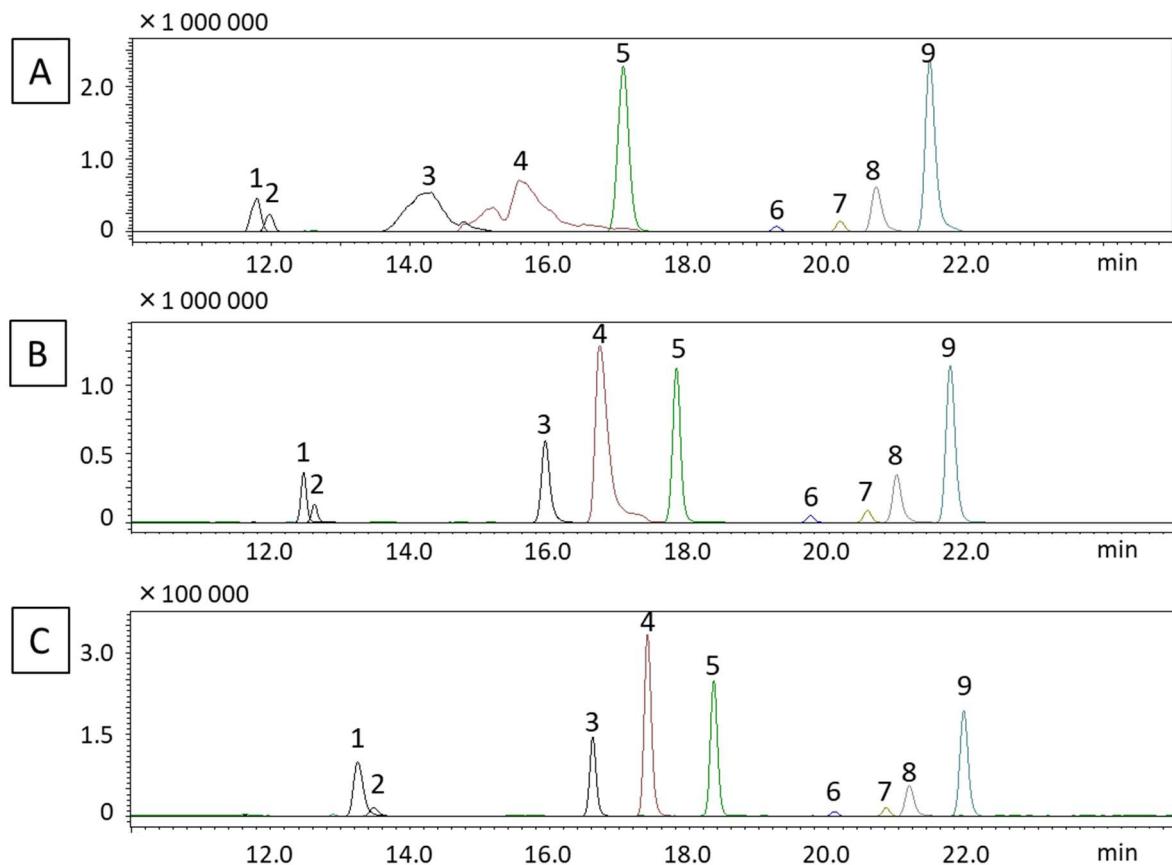


図 3-5. 異なる抽出物カラム導入量における 9 成分混合標準品の MRM クロマトグラム。

(A) 差圧 0.7 MPa の時のクロマトグラム; (B) 差圧 0.4 MPa の時のクロマトグラム; (C) 差圧 0.2 MPa の時のクロマトグラム; (1) シモキサニル, (2) フルアジナム, (3) ピラクロホス, (4) オキサミル, (5) エトフェンプロックス, (6) テフルベンズロン, (7) クロルフルアズロン, (8) イマゾスルフロン, (9) シクロスルファムロン.

3.3.5. タンデムクロマトグラフィー-SFC による分離性能の改善

分析カラムで保持が弱い成分の選択的保持のために、LC にない SFC の分離特性を利用した。SFC は、同じ移動相条件においても、カラム固定相を選択することで多様な分離を得ることができる[16-18, 36]。よって、分析カラムと対照的に目的化合物と相互作用するような固定相を分析カラムの前に接続することで、分析カラムで保持の弱い成分の選択的保持を達成できると考えた。また、SFC において、このような異なる選択性を有する 2 つのカラムを接続して分離すること(タンデムクロマトグラフィー-超臨界流体クロマトグラフィー、TC-SFC)は、高効率および多目的選択性を達成する有効な技術とされている[37, 38]。本試験

では、分析カラムは逆相系のカラムであるため、シリカゲル(SI)やシリカゲルに極性基のアミノプロピル(NH₂)、プロパンジオール(DIOL)、シアノプロピル(CN)を化学修飾した順相の固定相を接続した(表 3-8)。また、順相カラムの内径および粒子径は分析カラムと同じ 4.6 mm, 5 μm とした。次にカラム長さを決定した。イソクラティック条件においての検討ではあるが、Delahaye らの提唱する TC-SFC における stationary-phase optimized selectivity supercritical fluid chromatography (SOS-SFC) で予測される成分の保持係数は、それぞれの固定相における成分の保持係数とカラム長さに依存して予測されたことから[41]、固定相の性質に加えてカラム長さは保持に大きな変化を及ぼす要因であることが考えられた。本検討のゴールは分離全体に大きな変化をもたらすことではなく分析カラムで保持の弱い成分の選択的保持を達成することであり、且つカラムの長さは分析時間の延長につながるため、順相カラムの長さは比較的短い 50 mm とした。分析カラムと合わせるとカラム長さは 300 mm となつた。また、本試験では分析カラムの前に順相カラムを接続した。なぜなら、全項のとおり、分析カラムで保持の弱い成分は、抽出中に抽出溶剤の影響を受けてカラム先端捕捉が不十分になる。よって、対象成分と相互作用の強い固定相を分析カラムの前に接続することで、良好なカラム先端捕捉を得られると考えたからである。また、TC-SFC ではカラムを連結することにより、第1カラムの圧力が高くなり、移動相である超臨界流体の溶出力強さが増加して、予想したより保持が減少することが知られる[42]。そこで分析カラムと同じ固定相を持つ短いカラム(他の順相カラムと同じ内径、長さ、粒子径)を分析カラムと接続した場合と分離を比較することにより、カラムを連結することによる溶出力強さの増加を評価した。結果を表 3-9 および図 3-6 に示す。分析カラムと同じ固定相を持つ短いカラムを接続した場合、カラム長さは 250 mm から 300 mm と 1.2 倍に長くなったにも関わらず、保持時間の増加はわずか(全ての成分で 1.03 倍)であった。これはカラム入口圧の上昇による移動相の溶出力の増加を示唆したが、それにも関わらず極性基を化学修飾した順相カラムの接続は、試験に用いた農薬 9 成分の保持時間や半値幅に大きな変化をもたらした。まず分析カラムで保持が弱い成分については、SI を接続した場合にのみシモキサニルの保持を強め、フルアジナムのピーク形状改善を達成した。加えて、ピラクロホス、オキサミルの保持も SI によって大

きく変化し, ピラクロホスは CN<NH2<DIOL<SI の順で保持が強くなり, オキサミルは CN<DIOL<NH2<SI の順となった. 一方分析カラムで保持が強い成分, すなわちイマゾスルフロン, シクロスルファムロンは, CN や SI を接続した場合に, 保持に大きな変化は生じなかった. この結果は, West らが SI, および NH2, DIOL, CN を固定相とする SFC の分離を特徴付けた報告から説明ができる. SI は双極子誘起双極子相互作用に関連する分極, 双極子-双極子相互作用に関連する不均一電荷再分極, および水素結合に関連する酸塩基性の全てのタイプの極性相互作用を溶質と確立できるとされる[17]. よって逆相カラムで保持の弱い, 極性の高い化合物の選択的保持が達成されたと考える. また SI は, 溶質の炭化水素量によって, 保持が減少することから, 高極性化合物でありながら比較的分子量の大きなイマゾスルフロンならびにシクロスルファムロンの保持を強めなかつたと考える. またこの結果より, SI と分析カラムの分離特性の直行性が示唆され, このようなカラムの組み合わせは, 試験に用いたような幅広い極性の化合物に合理的な分離を提供することがわかつた. 以上より, SFE-SFC システムにおける抽出溶剤の分離への影響を低減する方策として, スプリットフロー技術による抽出物部分導入に加えて, TC-SFC による分析カラムで保持の弱い成分の選択的保持技術を確立した. この技術によって, システムの実用性は格段に向上すると考える. なお, これまで, SFE-SFC システムにおいて, 分析カラムで保持が弱い成分の選択的保持のために TC-SFC を適用し, 達成した事例はない.

表 3-8. 試験に用いた固定相.

略称	固定相の性質	製造者	製品名
SI	シリカゲル	GL Sciences, Inc.	Inersil SIL 100-A
NH2	アミノプロピル基		Inersil NH2
DIOL	プロパンジオール基		Inertsil Diol
CN	シアノプロピル基		Inertsil CN-3

表 3-9. 異なる順相カラム接続における分離性能の比較.

成分名	分析カラムのみ				短い分析カラム				SI		NH2		DIOL		CN			
	保持 時間 (min)	W ₅₀ ^a	シンメトリ 係数	保持 時間 (min)	W ₅₀	シンメトリ 係数												
シモキサニル	13.1	0.128	1.28	13.4	0.156	1.22	16.3	0.132	1.04	15.0	0.674	1.45	13.9	0.191	1.29	14.0	0.299	1.53
フルアジナム	13.3	0.129	1.29	13.7	0.147	1.16	13.9	0.098	1.21	13.8	0.104	1.17	13.7	0.111	1.15	13.9	0.145	1.27
ピラクロホス	16.4	0.113	1.15	17.0	0.115	1.10	17.9	0.122	1.05	17.3	0.137	1.88	17.7	0.141	1.04	17.1	0.108	1.15
オキサミル	17.2	0.136	1.18	17.7	0.125	1.10	21.5	0.132	0.98	20.4	0.123	0.98	19.7	0.130	1.07	18.5	0.110	1.08
エトフェンプロックス	18.2	0.143	1.04	18.8	0.139	1.05	18.9	0.109	1.06	18.8	0.114	1.05	18.8	0.143	1.03	18.8	0.113	1.08
テフルベンズロン	20.0	0.142	1.04	20.6	0.14	1.06	21.0	0.118	1.03	21.2	0.121	1.05	21.2	0.140	1.01	20.9	0.119	1.06
クロルフルアズロン	20.8	0.154	1.06	21.4	0.148	1.06	21.6	0.126	1.06	22.0	0.119	1.04	22.0	0.154	1.03	21.6	0.134	1.06
イマゾスルフロン	21.2	0.188	1.33	21.9	0.18	1.20	23.0	0.154	1.37	27.1	0.114	1.12	23.4	0.176	1.21	22.0	0.155	1.35
シクロスルファムロン	21.9	0.162	1.00	22.6	0.159	1.06	23.1	0.132	1.13	25.1	0.107	1.06	23.8	0.159	1.02	22.9	0.132	1.14

^a 半値幅.

廃棄側 BPR 圧力: 15.0 MPa, カラム側 BPR 圧力: 14.8 MPa; 他の条件は表 3-5 と同様.

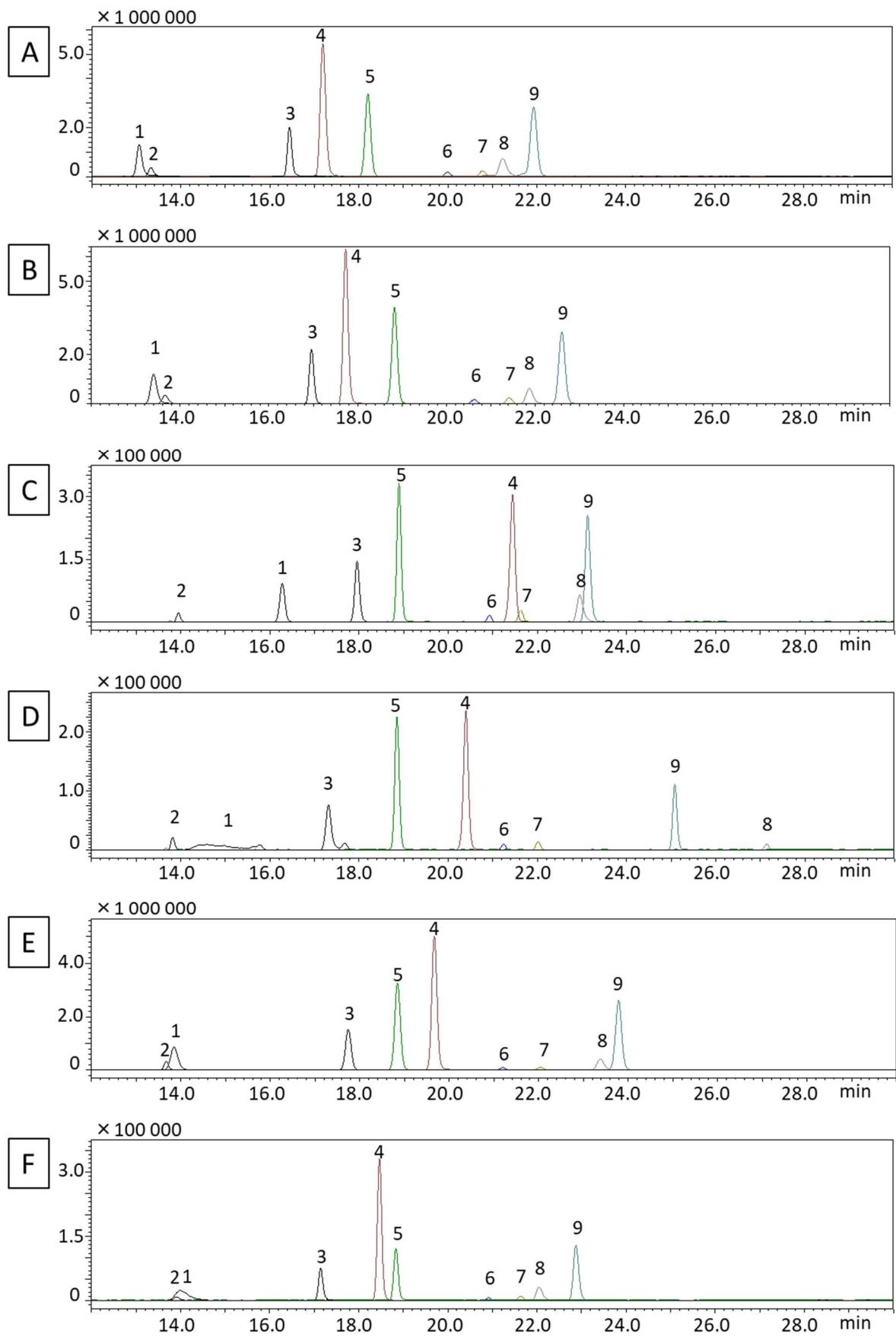


図 3-6. 異なる順相カラム接続における 9 成分混合標準品の MRM クロマトグラム.

(A)分析カラムのみのクロマトグラム, (B)短い分析カラム接続時クロマトグラム, (C)SI 接続時クロマトグラム,
(D)NH₂ 接続時クロマトグラム, (E)DIOL 接続時クロマトグラム, (F)CN 接続時クロマトグラム; (1)シモキサニル,
(2) フルアジナム, (3)ピラクロホス, (4) オキサミル, (5) エトフェンプロックス, (6) テフルベンズロン, (7) クロルフ
ルアズロン, (8) イマゾスルフロン, (9) シクロスルファムロン.

3.3.6. SFE-SFC における SFE 抽出効率算出のためのオートサンプラー標準導入システム の開発

前述のとおり, SFE-SFC システムにおける SFE 抽出効率の計算は, 抽出ユニットが分離/検出ユニットにオンラインで接続されているという事実によって複雑になっている. 一般的に抽出効率は, 抽出工程を介さずに得られた標準物質(標準)と抽出工程を介して得られた標準添加試料(添加試料)の量を比較することで算出できるが, 両者の SFC への導入溶媒やその量, 注入バンド幅, マトリクスの違いにより, 正確な抽出効率の算出ができないという課題があった. そこで, 陰性試料の抽出中に標準をインジェクターから注入するようプログラムを設定することにより, 標準と添加試料の SFC へ導入される溶媒やその量ならびにマトリクスを同一化することが可能となった. だが, 依然として両者の注入バンド幅が異なるという課題があった. 本システムでは, 注入された試料はその後スプリットされる仕組みであるため, 両者の注入バンド幅が極端に異なる条件においても, そのスプリット挙動が同一であれば, 両データを比較することは可能と考えた. そこで, 異なる注入バンド幅がスプリットに与える影響について検討し, 両者のスプリット挙動の同一化を試みた.

3.3.7. オートサンプラーから注入した標準の注入バンド幅拡張とスプリット比同一化のための検討

試験に用いた 9 成分のうちエトフェンプロックスを用いて, 3 種の注入バンド幅を再現し, 注入バンド幅がスプリット挙動に与える影響を検討した. 本試験では, オートサンプラーの直後に, LC において流路上で複数の溶媒を混合するときに用いられるミキサーを設置して,

オートサンプラーから注入された成分のバンド幅拡張を試みた。ミキサーを選択した理由としては、多流路に拡散して、注入バンド幅を効率的に拡張できると考えたからである。まず、オートサンプラーと PDA 検出器を直結させてオートサンプラーから導入した成分の注入バンド幅を観測し、その後オートサンプラーの直後にミキサーを接続して、拡張された注入バンド幅を観測した。非拡張および拡張区(容量= 0.5 および 7.8 mL(2.6 mL ミキサーを 3 つ接続))のバンド幅は、流量条件 4.00 mL min^{-1} の時にそれぞれ 0.1 min(図 3-7A), 0.6 min(図 3-7B), および 1.7 min(図 3-7C)となり、ミキサー容量が大きくなるとバンド幅は広くなつた。また実際の SFE からの注入バンド幅は、流量条件 4.00 mL min^{-1} の時に 1.5 から 7.5 min と化合物に応じて異なっており(3.3.2 の検討で観測)，1.7 min のバンド幅が得られた 7.8 mL 容量のミキサー接続は、SFE からの注入バンド幅を再現したものと言える。次に、各注入バンド幅におけるスプリット挙動を確認した。表 3-10 に示すように、広いバンド幅(0.6 および 1.7 min)は、狭い注入バンド幅に比べて、カラムへの試料導入割合が小さく、導入再現性も良好であった。この現象の要因として、BPR 圧力制御に起因するわずかな流量変動が考えられた。本装置の圧力は、BPRにおいて、電気的に弁を開閉することにより維持されているため、弁の開閉のタイミングでわずかに流量の変動が生じる。流量変動の影響はバンド幅によって異なり、バンド幅が狭い程影響が大きいと考えられた。この考えに基づけば、狭い注入バンド幅を持つオートサンプラー注入と、広い注入バンド幅を持つ SFE 注入のスプリット挙動を同一化するのは困難かと思われた。しかしながら、SFE からの注入を再現した 1.7 min のバンド幅と、0.6 min のバンド幅のスプリット挙動は同等であったことから、流量変動の影響は、ある一定のバンド幅を超えた時に無視できることが考えられた。この仮定に従えば、オートサンプラーからの注入バンド幅を 0.6 min 以上に拡張することで、オートサンプラーならびに SFE 注入のスプリット挙動を同一化することが可能となる。この仮定の正当性を確認するため、次項でさらに検討を進めた。

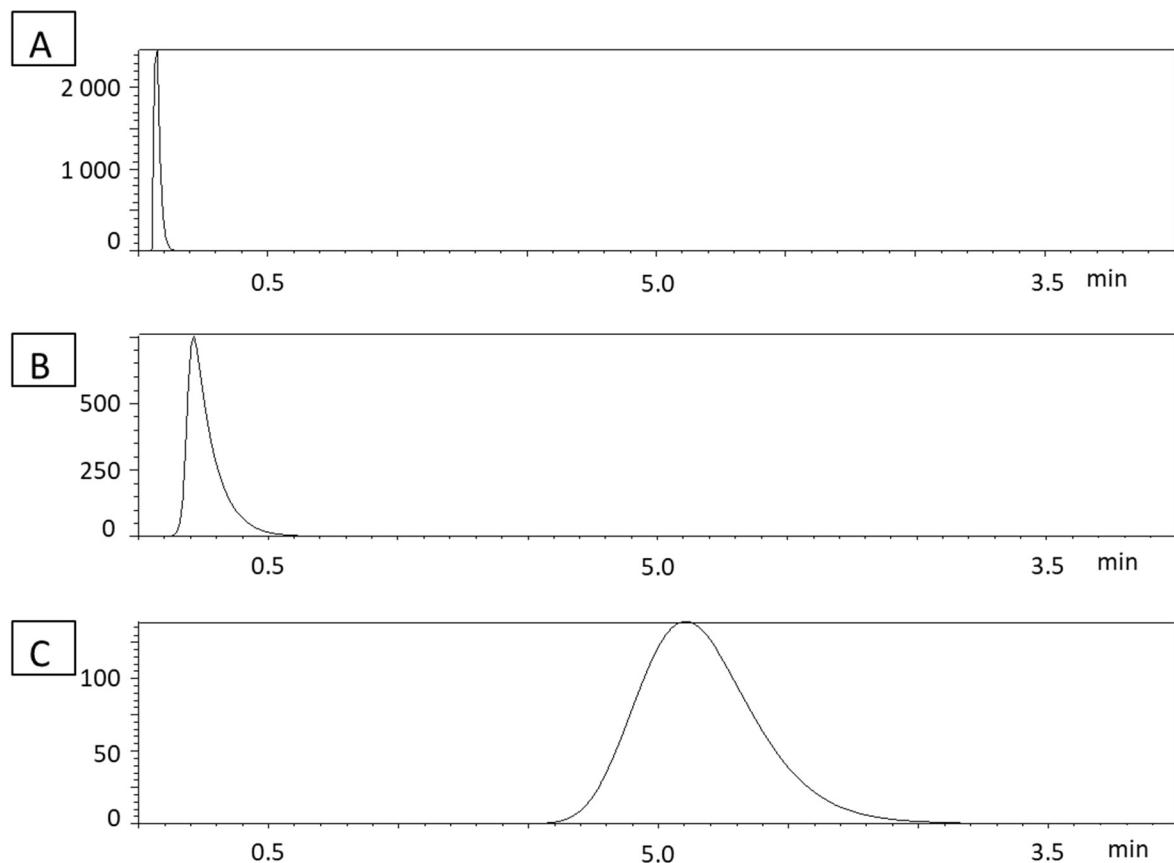


図 3-7. 異なる注入条件における注入バンド幅(エトフェンプロックス).

(A) 非拡張注入時の注入バンド幅; (B) 0.5 mL ミキサー接続時の注入バンド幅; (C) 2.6 mL ミキサー×3 (7.8 mL)接続時の注入バンド幅.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 40.0 MPa; 抽出法: 流量: 4.00 mL min^{-1} , 移動相 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 %(W/V)ギ酸アンモニウム-メタノール溶液), メイクアップポンプ流量: 0.10 mL min^{-1} , サンプリング: 10.0 min, 注入: $1,000 \text{ mg L}^{-1}$, $5.0 \mu\text{L}$ (フルループ注入, アセトン).

表 3-10. 注入バンド幅のスプリット挙動への影響.

成分名	初期条件		0.5 mL 容ミキサー接続		7.8 mL 容ミキサー接続	
	試料導入 再現性 ^a	試料導入 割合 (%)	試料導入 再現性	試料導入 割合 (%)	試料導入 再現性	試料導入 割合 (%)
シモキサニル	- ^b	-	-	-	-	-
フルアジナム	-	-	-	-	-	-
ピラクロホス	24	1.5	1.6	1.2	4.9	1.2
オキサミル	27	1.5	3.7	1.1	6.0	1.1
エトフェンプロックス	25	1.5	1.8	1.2	7.2	1.1
テフルベンズロン	23	1.6	2.3	1.2	6.7	1.1
クロルフルアズロン	23	1.6	2.2	1.2	5.5	1.2
イマゾスルフロン	23	1.5	2.4	1.2	5.5	1.2
シクロスルファムロン	24	1.6	1.7	1.2	6.0	1.1

^a面積値の相対標準偏差.

^b シモキサニル とフルアジナムは共溶出した.

廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 14.8 MPa, 抽出法: 流量: 4.00 mL min⁻¹, 移動相 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液), メイクアップポンプ流量: 0.65 mL min⁻¹, サンプリング: 10.0 min, 注入: 1,000 mg L⁻¹, 5.0 µL (フルループ注入, アセトン). n= 5.

3.3.8. オートサンプラー標準導入システムによる SFE 抽出効率算出精度の検証

次に, 開発したオートサンプラー標準注入システムにより算出された抽出効率精度を確認した. オートサンプラーの直後に 0.5 mL 容量のミキサーを設置したオンライン SFE-SFC システムを用いて SFE 抽出効率を算出し, 同じ条件で抽出を行ったオフライン SFE の抽出効率と比較した. 表 3-11.および 3-12 に示すように, オートサンプラーから注入した標準の検量線は $r^2 = 0.989\text{--}0.999$ で良好な直線性を示した. 加えてオートサンプラーから注入した標準と SFE から注入した添加試料における各化合物の保持時間はほぼ同じであり, 両者の値の比較は可能であった. 計算された抽出効率は 100 ng 添加で 82~105 ng となった. 次に, 算出した抽出効率とオフライン SFE で測定された抽出効率とを比較した(表 3-12, 表 3-13). 2 つの方法の間に大きな抽出効率の差はなく, 化合物ごとの抽出効率の傾向も類似した. したがって, 標準を陰性試料の抽出中にオートサンプラーから注入して物理的に注入

バンド幅を拡張することにより、標準および添加試料の SFC への導入溶媒およびその量、マトリクスならびにスプリット挙動を同一化し、高精度な抽出効率の算出を達成した。また、事前に検量線の直線性を確認しておけば少ない検量点での抽出効率算出が可能となるため、非常に簡便に抽出効率を算出することができるところがわかった。

表 3-11. オートサンプラーから注入した標準の保持時間と検量線直線性^a。

成分名	保持時間 ^b (min)	r ²	範囲(ng)
フルアジナム	18.4	0.999	5–200
シモキサニル	18.4	0.999	
ピラクロホス	22.1	0.999	
エトフェンプロックス	23.8	0.997	
オキサミル	24.1	0.999	
テフルベンズロン	25.8	0.998	
クロルフルアズロン	26.6	0.995	
イマゾスルフロン	27.3	0.989	
シクロスルファムロン	28.0	0.997	

^a 試料: 脱水剤、抽出法: スタティック 2.5 min, ダイナミック 12.5 min, 抽出終了後のサンプリング: 1.0 min (5% モディファイア), 0.5 min (超臨界流体二酸化炭素), 抽出溶剤: 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液), 抽出流量: 4.00 mL min⁻¹; 廃棄側 BPR: 15.7 MPa, カラム側 BPR: 15.5 MPa, メイクアップポンプ溶媒: 超臨界流体二酸化炭素 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液, メイクアップポンプ流量: 0.65 mL min⁻¹; 注入: 5, 10, 25, 50, 100, and 200 ng/2.0 μL (パーシャルループ注入, アセトン)。

^b 各濃度の平均保持時間。

表 3-12. オンライン SFE-SFC/MS で測定した添加試料の SFE 抽出効率^a.

成分名	保持時間 ^b (min)	RSD% n = 6		回収率 (%)
		保持 時間	面積値	
フルアジナム	18.4	0.062	18	87
シモキサニル	18.4	0.079	13	82
ピラクロホス	22.1	0.056	12	80
エトフェンプロックス	23.8	0.032	21	93
オキサミル	24.2	0.083	18	86
テフルベンズロン	25.8	0.031	16	83
クロルフルアズロン	26.6	0.026	15	83
イマゾスルフロン	27.4	0.066	32	105
シクロスルファムロン	28.0	0.019	28	95

^a試料: 脱水剤と標準溶液の混合物, 測定条件は 3-9 と同じ. 注入: アセトン 2.0 μL (パーシャルループ注入).

^b 各濃度の平均保持時間.

表 3-13. オフライン SFE で測定した添加試料の SFE 抽出効率^a.

成分名	保持時間 ^b (min)	RSD% n = 3		回収率(%)
		保持 時間	面積値	
フルアジナム	2.2	0.23	12	81
シモキサニル	3.3	0.38	27	89
ピラクロホス	5.2	0.19	4.7	90
エトフェンプロックス	6.9	0.15	12	90
オキサミル	6.0	0.23	16	82
テフルベンズロン	8.6	0.13	13	86
クロルフルアズロン	9.4	0.086	8.7	77
イマゾスルフロン	9.8	0.16	27	117
シクロスルファムロン	10.5	0.10	14	97

^a抽出法: スタティック 2.5 min, ダイナミック 12.5 min, 抽出終了後のサンプリング: 1.0 min (5% モディファイア), 0.5 min (超臨界流体二酸化炭素), 抽出溶剤: 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液), 抽出流量: 4.00 mL min⁻¹; 廃棄側 BPR: 15.0 MPa, メイクアップポンプ溶媒: 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液, メイクアップポンプ流量: 0.10 mL min⁻¹.

^b 各濃度の平均保持時間.

3.3.9. 実試料を用いた SFE-SFC システムの評価

最後に、構築した新規スプリットフロー技術を組み込んだ SFE-SFC システムの実用性を評価した。緒論で述べたように、SFE-SFC システムは、成分分析プロセス全体の完全自動化によりサンプルスループットの向上や、閉鎖系システムにより分析対象成分の変性リスクの低減も期待される。さらに超臨界流体二酸化炭素の特性から多様な分析種の高速分析が期待できる。そこで、このような高精度ハイスループット分析が重要とされる食品中残留農薬分析に本システムを適用した。ここでは、幅広い極性を持つ農薬成分ならびに光で分解しやすい農薬成分を選定し、それらを添加した試料を SFE-SFC システムで分析した。測定に用いた 9 成分の MRM を表 3-14 に、測定結果を表 3-15 に示す。厚生労働省ガイドラインに沿って選定した 6 試料(リンゴ、玄米、ホウレンソウ、キャベツ、サツマイモ、茶)に残留農薬分析において必要感度とされる試料中濃度 0.01 ppm の農薬成分を添加した試料の分析値は、ほとんどの成分と作物の組み合わせで当該ガイドラインの目標値を達成した。達成できなかった区分は、他の作物で達成できていることを考慮すると、共溶出するマトリクスによるイオン化抑制が要因として考えられた。これについては、実際の使用の場面で、採取試料量やスプリット比を作物ごとに微調整することにより改善できると考える。よって、本システムを用いることにより、多様な作物種において、残留農薬分析で必要とされる感度を確保した幅広い極性の農薬成分の測定や光分解性農薬の測定が可能であることが示唆された。また、本システムを用いた残留農薬分析の測定時間は、試料の粉碎から測定終了まで約 50 min であり、従来法の 7~8 時間に比べて非常に高いサンプルスループットとなった。以上のこどから、新規スプリットフロー技術を組み込んだ SFE-SFC システムは、高精度ハイスループットを可能とする有用性の高いシステムと考える。

表 3-14. 試験に用いた化合物の MRM パラメータ.

成分名	選択	プリカーサー	プロダクト	Q1 プレロット ^a	コリジョン	Q3 プレロット ^a
	イオン	イオン	イオン	バイアス	エネルギー	バイアス
	[m/z]	[m/z]	[V]	[V]	[V]	
プロポキスル	[M+H] ⁺	210.0	111.1	-30	-16	-17
ピリミカルブ	[M+H] ⁺	239.1	72.2	-30	-22	-29
マクバール	[M+NH ₄] ⁺	197.1	123.1	-13	-16	-21
メチオカルブ	[M+NH ₄] ⁺	243.1	121.1	-30	-24	-19
ホキシム	[M+H] ⁺	299.0	96.9	-19	-26	-15
ベンスリド	[M+NH ₄] ⁺	415.0	158.0	-14	-31	-25
ベンフラカルブ	[M+H] ⁺	410.9	195.1	-27	-26	-18
トリフルミゾール	[M+H] ⁺	346.2	278.1	-12	-11	-29
カルボスルファン	[M+H] ⁺	380.9	118.2	-25	-22	-20

表 3-15. 農薬標準品添加試料(0.010 ppm)の測定精度^a.

成分名	リンゴ	玄米	ホウレンソウ	キャベツ	サツマイモ	茶
	平衡精度 ^b	平衡精度	平衡精度	平衡精度	平衡精度	平衡精度
プロポキスル	16	9.2	≥25	11	14	11
ピリミカルブ	6.1	3.8	11	9.3	3.2	20
マクバール	11	6.8	11	9.6	9.6	22
メチオカルブ	15	4.4	14	6.7	16	12
ホキシム	12	≥25	6.9	10	12	22
ベンスリド	15	16	≥25	15	13	24
ベンフラカルブ	26	5.4	18	12	8.2	20
トリフルミゾール	5.7	6.4	14	13	13	10
カルボスルファン	11	4.5	24	5.5	7.9	11

^a 抽出法: スタティック 2.0 min, ダイナミック 3.0 min, 抽出終了後のサンプリング: 1.0 min (5% モディファイア), 0.5 min (超臨界流体二酸化炭素), 抽出溶剤: 95:5 (超臨界流体二酸化炭素 : 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液), 抽出流量: 5.00 mL min⁻¹; 廃棄側 BPR: 15.0 MPa, カラム側 BPR: 14.8 MPa, メイクアップポンプ溶媒: 0.1 % (W/V) ギ酸アンモニウム-メタノール溶液, メイクアップポンプ流量: 0.50 mL min⁻¹.

^b 面積値の相対標準偏差, n=5.

3.4. 小括

本研究では、第2章で開発したスプリットフロー技術をSFE-SFCシステムに組み込むことにより、SFE-SFCシステムにおける親水性化合物を含む広範囲の化合物の一斉抽出および分離を可能にした。具体的には、最適なBPR差圧とマイクアップポンプ流量でSFEから転送される抽出物の少量をSFCカラムに導入することにより、抽出溶剤を含む抽出物の存在によって引き起こされる目的化合物のピーク形状の悪化や保持の減少を改善した。さらに分析カラムと異なる分離メカニズムを備えたカラムを分析カラムの前に接続することにより、既に分析カラムに強く保持されている化合物の保持時間を延長することなく、分析カラムで保持の弱い化合物の分離が改善される理想的な分離を達成した。

次に、SFE-SFCシステムにおけるSFEの抽出効率を算出するためのオートサンプラー標準注入システムを開発した。抽出効率を決定するために、標準(オートサンプラーで注入)と添加試料(SFEから溶出)の注入条件を同一化した。サンプル注入条件(注入量/溶媒およびマトリックス)は、陰性試料の抽出中にオートサンプラーを介して標準を注入することにより同一化された。さらに、スプリットフロー技術を組み込んだSFE-SFCシステムにおいては、注入された試料はその後SFCカラムへスプリット導入されるため、オートサンプラー注入試料とSFE注入試料は同一のスプリット挙動を示す必要があった。両者の大きな違いは注入バンド幅であり、オートサンプラー注入は細く、SFE注入は広く、バンド幅の違いはスプリット挙動の違いを生じさせた。そこで、オートサンプラー注入バンド幅をオートサンプラーの直後に設置したミキサーによって拡張することで、両者のスプリット挙動の同一化が達成された。最後に、構築した新規スプリットフロー技術を組み込んだSFE-SFCシステムの実用性を、高精度ハイスループット分析が重要とされる食品中残留農薬分析で評価した。その結果、従来法より高いサンプルスループットで、残留農薬分析で必要とされる感度を確保した、幅広い極性および光分解性の農薬成分の測定が可能であった。

以上のように、抽出物のスプリットや、分析カラムと異なる分離機構を持つカラムの接続、抽出効率算出のためのシステムの開発により、SFE-SFC システムの実用化のための基盤技術を構築した。

第4章 総括と今後の展望

超臨界流体二酸化炭素を用いたオンライン SFE-SFC システムは、超臨界流体二酸化炭素とオンライン装置の特性から、理論上幅広い化合物に対して迅速で精度の高い測定を可能にするが、これまで実用化されていなかった。なぜなら SFE から分離カラムに流れ込む多量の抽出物や抽出溶剤が分離時のピーク形状に影響を与えるばかりでなく、カラムや検出器において深刻な汚染を引き起こすという問題があったからである。加えて、抽出から検出までの工程が繋がっているため、測定精度に関わる SFE における抽出効率の算出ができないなどの潜在的な課題も残っていた。よって本研究では、SFE-SFC システムの実用化のための基盤技術を構築することを目的とし、SFE から SFC へ導入する抽出物を調節して少量を導入するスプリットフロー技術を開発した。また、SFE 抽出効率の算出を可能とするオートサンプラー標準導入システムを開発した。

まず第二章では、新規スプリットフロー技術を考案し、その制御要因を明らかにした[発表論文 1]。考案したスプリットフロー技術とは、SFC カラム前で分岐した 2 つの流路(一方は廃棄側流路、他方はカラム側流路)に各々 BPR を設置するもので、スプリット導入は、BPR の差圧ならびに移動相条件やカラム条件が関連することを明らかにした。さらに、メイクアップポンプ流量により、スプリット導入を制御可能であることを発見した。開発したスプリットフロー技術は、一般的なスプリット法に比較して以下の点について画期的な技術と言える。これまでのスプリットは、両流路の配管の長さおよび内径を変更することにより調整してきたが、本技術は両流路の出口圧力を BPR によって任意に設定して流れを制御するという、従来とは異なる新しい考え方でデザインされたものである。現在 BPR やメイクアップポンプを用いた超臨界流体の流量制御に関する特許申請を準備している。加えて、両流路の差圧を変更することにより、従来実現できなかったスプリット比の連続的な調節が可能となり、さらにメイクアップポンプからの溶媒の追加によって高スプリットを実現できることから、技術的進歩性もあると考える。ただし本技術は、本研究において使用した少ないデッドボリュームによつて高精度に圧力を制御可能な BPR を用いることによってのみ達成されるものである。

次に第三章では、新規スプリットフロー技術を組み込んだ SFE-SFC システムにおいて、SFE から SFC へ導入される抽出物量減少による分離改善について検証し、潜在的な課題である SFE 抽出効率の算出について議論した[発表論文 2]。新規スプリットフロー技術を用いて SFE 抽出物の SFC への導入量を減少させることにより、ピーク形状の悪化や保持の減少を抑えることができた。次に、さらなる実用性向上のため、分析カラムで保持の弱い成分の選択的保持を試みた。具体的には、SFC の分離特性を活かして、順相カラムを分析カラムである極性基内包型逆相カラムと直列に接続した(TC-SFC)。本研究では、分析カラムの 1/5 の長さの短いカラムを分析カラムの前に接続するデザインを採用した。なぜならば、成分の選択的保持のためには、第 1 のカラムで目的化合物と固定相を相互作用させることが重要であることと、加えて、第 1 カラム長さが長い場合、保持改善の目的を超えて、分離に大きく影響を与えることが予想されたためである。その結果、4 つの固定相の中から、既に分析カラムに強く保持されている化合物の保持時間を延長することなく、分析カラムで保持の弱い化合物の選択的保持を可能とする固定相を選択することができた。このことは、SFE-SFC システムにおいて、高スプリットと TC-SFC を組み合わせることにより、幅広い極性の化合物の一斉抽出および分離が可能となることを示唆した。一方で、TC-SFC は目的の選択性を達成するカラムの組み合わせを見つけるために多くの時間を費やし、組み合わせによっては一方のカラムが他方のカラムの選択性に全く影響しない、あるいは選択性をキャンセルしてしまう場合があるなど課題がある[35]。それでも関わらず本研究で直観的にカラムを選択できた理由としては、それぞれの工程における流量の違いが考えられた。新規スプリットフローを導入した SFE-SFC システムでは、SFE からの抽出物は高いスプリット比で分岐され、低い流量条件で第 1 カラム導入されるため、第 1 カラムとの親和性が高い化合物はカラム先端に濃縮され、物質移動はほとんど起こらない。一方、第 1 カラムと親和性の低い化合物はカラム内を移動し、第 1 カラムの短さのため、場合によっては第 2 カラムまで移動して先端で濃縮される。その後抽出終了と同時に高流量で移動相が流入し分離が開始されるが、低流量導入時に第 1 カラムにとどまった化合物は、第 1 カラムと相互作用しながら分離されるためカラム追加接続の前後で分離に違いが生まれ、第 2 カラムの先端にとどまっていた化合

物は、カラムを追加接続する前とほぼ同じ条件で分離が開始されるため、カラム追加接続前後で分離に差がでにくい。通常の TC-SFC も、第 1 カラムから溶出した成分は第 2 カラムへと連続的に移動するが、通常高い流量条件下で実施されるため、本研究のようなカラム先端濃縮の差が顕著に表れにくいと考える。これまで TC-SFC において、流量の分離への影響は議論されていないが、本結果より、SFE-SFC システムにおいてだけではなく、SFC においても分離をカスタマイズする有効な要素となるのではないかと考える。

次に、SFE-SFC システムにおける SFE の抽出効率を算出するためのオートサンプラー標準注入システムを開発した。陰性試料抽出中に標準の注入バンド幅を一定のバンド幅に拡張して導入することにより、オートサンプラーおよび SFE 注入の注入条件ならびにスプリット挙動を同一化し、抽出効率の算出を達成した。高い抽出効率は検出感度の向上と測定再現性に寄与すること、また抽出効率(真度あるいは回収率と定義される)は、食品や医療等の分野における分析法のガイドラインにおいて必須評価項目であるという事実を考慮すると、上記のオートサンプラー標準導入システムの開発は多くの分野での SFE-SFC システムの適用において実用的意義があると考える。

本研究で開発した SFE-SFC システムへのスプリットフロー技術の導入や TC-SFC は、抽出溶剤の分離への影響を低減することができるため、柔軟な抽出溶剤の選択を可能にする。これによって、従来適用してきた低極性から中極性の化合物に加えて、高極性の化合物にまで適用範囲が広がると考える。また、オートサンプラー標準導入システムを用いた SFE 抽出効率の算出によって、測定の最適化が容易となり、これまで以上により高い精度での測定も見込まれる。以上のことから、本研究は、測定化合物の適用範囲や測定精度の面から SFE-SFC の実用性を飛躍的に向上させる確実な一歩となると考える。今後は、SFE-SFC システムの実用性評価の項で示したように、高精度ハイスループットクリーニングが重要な分野、特に食品中残留農薬分析や臨床検査などへの SFE-SFC システムの適用が期待される。

引用文献

1. 佐古猛, 岡島いづみ: 超臨界流体のはなし, pp13-14, 日刊工業新聞社 (2006).
2. Lang, Qingyong, and Chien M. Wai.: Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta* **53.4**, 771-782 (2001).
3. Joung, S. N., Yoo, C. W., Shin, H. Y., Kim, S. Y., Yoo, K. P., Lee, C. S., & Huh, W. S. : Measurements and correlation of high-pressure VLE of binary CO₂-alcohol systems (methanol, ethanol, 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol). *Fluid Phase Equilibria*, **185.1-2**, 219-230(2001)..
4. King, Jerry W.: Modern supercritical fluid technology for food applications. Annual review of food science and technology **5**, 215-238 (2014).
5. Marsili, Ray, and Daniel Callahan.: Comparison of a solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of α-and β-carotene in vegetables. *Journal of chromatographic science* **31.10**, 422-428 (1993).
6. Brühl, Ludger, and Bertrand Matthäus.: Extraction of oilseeds by SFE—a comparison with other methods for the determination of the oil content. *Fresenius' journal of analytical chemistry* **364.7**, 631-634(1999).
7. 長浜邦雄, 鈴木功: 食品への超臨界流体応用ハンドブック, pp42-55, 株式会社サイエンスフォーラム (2002).
8. Hawthorne, S. B., Rickkola, M. L., Screnius, K., Holm, Y., Hiltunen, R., & Hartonen, K.: Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, **634.2**, 297-308 (1993).
9. Saito, M., Yamauchi, Y., Kashiwazaki, H., & Sugawara, M.: New pressure regulating system for constant mass flow supercritical-fluid chromatography and physico-chemical analysis of mass-flow reduction in pressure programming by analogous circuit model. *Chromatographia*, **25.9**, 801-805 (1988).

10. **Poole, Colin F., ed.:** Supercritical fluid chromatography. pp4, Elsevier (2017).
11. **Novotny, M., W. Bertsch, and A. Zlatkis.:** Temperature and pressure effects in supercritical-fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **61**, 17-28 (1971).
12. **Novotny, M., Springston, S. R., Peaden, P. A., Fjeldsted, J. C., & Lee, M. L.:** Capillary supercritical fluid chromatography. *Analytical Chemistry*, **53.3**, 407-414 (1981).
13. **Gere, Dennis R., Robert Board, and Douglass McManigill.:** Supercritical fluid chromatography with small particle diameter packed columns. *Analytical Chemistry*, **54.4**, 736-740 (1982).
14. **Berger, Terry A., and William H. Wilson.:** Packed column supercritical fluid chromatography with 220,000 plates. *Analytical Chemistry*, **65.10**, 1451-1455(1993).
15. **Poole, Colin F., ed.:** Supercritical fluid chromatography. pp10, Elsevier (2017).
16. **West, C., and E. Lesellier.:** Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: I. Alkylsiloxane-bonded stationary phases. *Journal of Chromatography A*, **1110.1-2**, 181-190 (2006).
17. **West, C., and E. Lesellier.:** Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model: III. Polar stationary phases. *Journal of Chromatography A*, **1110.1-2**, 200-213 (2006).
18. **West, C., and E. Lesellier.:** Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model IV: aromatic stationary phases. *Journal of Chromatography A*, **1115.1-2**, 233-245 (2006).
19. **Lesellier, E., & West, C.:** The many faces of packed column supercritical fluid chromatography—a critical review. *Journal of Chromatography A*, **1382**, 2-46(2015).
20. **Hyötyläinen, Tuulia.:** Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1153.1-2**, 14-28 (2007).
21. **Pan, J., Zhang, C., Zhang, Z., & Li, G.:** Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, **815**, 1-15 (2014).

22. **Sánchez-Camargo, A. D. P., Parada-Alfonso, F., Ibáñez, E., & Cifuentes, A.:** On-line coupling of supercritical fluid extraction and chromatographic techniques. *Journal of separation science*, **40.1**, 213-227 (2017).
23. **Engelhardt, H., & Gross, A.:** On-line extraction and separation by supercritical fluid chromatography with packed columns. *Journal of High Resolution Chromatography*, **11.1**, 38-42 (1988).
24. **Jahn, K. R., & Wenclawiak, B.:** Direct on-line coupling of small subcritical and supercritical fluid extractors with packed column supercritical fluid chromatography. *Chromatographia*, **26.1**, 345-350 (1988).
25. **Nishikawa, Y.:** Application of supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography to pesticide residue analysis. *Analytical sciences*, **7.4**, 567-572 (1991).
26. **Masuda, M., Koike, S., Handa, M., Sagara, K., & Mizutani, T.:** Application of supercritical fluid extraction and chromatography to assay fat-soluble vitamins in hydrophobic ointment. *Analytical sciences*, **9.1**, 29-32 (1993).
27. **Yarita, T., Nomura, A., Horimoto, Y., & Gonda, S.:** On-line coupled supercritical fluid extraction and chromatography for the determination of thiolcarbamate herbicides in soil matrix. *Journal of Chromatography A*, **750.1-2**, 175-181 (1996).
28. **Sato, K., Sasaki, S. S., Goda, Y., Yamada, T., Nunomura, O., Ishikawa, K., & Maitani, T.:** Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of Capsicum. *Journal of agricultural and food chemistry*, **47.11**, 4665-4668 (1999).
29. **Okamoto, D., & Hirata, Y.:** Development of supercritical fluid extraction coupled to comprehensive two-dimensional supercritical fluid chromatography (SFE-SFC \times SFC). *Analytical sciences*, **22.11**, 1437-1440 (2006).
30. **Matsubara, A., Harada, K., Hirata, K., Fukusaki, E., & Bamba, T.:** High-accuracy analysis system for the redox status of coenzyme Q10 by online supercritical fluid extraction-

supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1250**, 76-79 (2012).

31. **Uchikata, T., Matsubara, A., Fukusaki, E., & Bamba, T.**: High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis. *Journal of Chromatography A*, **1250**, 69-75 (2012).
32. **Ono, Y., Yamagami, T., Nishina, T., & Tobino, T.**: Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction. *Analytical Sciences*, **22.11**, 1473-1476 (2006).
33. **Saito-Shida, S., Nemoto, S., & Matsuda, R**: Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by supercritical fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **55.3**, 142-151(2014)..
34. **Ishibashi, M., Ando, T., Sakai, M., Matsubara, A., Uchikata, T., Fukusaki, E., & Bamba, T.**: High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1266**, 143-148 (2012).
35. **Janssen, H. G., Snijders, H. M., Rijks, J. A., Crarners, C. A., & Schoenmakers, P. J.**: The effects of the column pressure drop on retention and efficiency in packed and open tubular supercritical fluid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, **14.7**, 438-445 (1991).
36. **West, C., & Lesellier, E.**: A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1191.1**, 21-39 (2008).
37. **Poole, Colin F., ed.**: Supercritical fluid chromatography. pp153-172, Elsevier (2017).
38. **C. West, E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, E. Lesellier.**: Interest of achiral-achiral tandem columns for impurity profiling of synthetic drugs with supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1534**, 161–169 (2018).

39. 厚生労働省 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン
<https://www.mhlw.go.jp/content/000334675.pdf>
40. **Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E.**: Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, **1217.16**, 2495-2511(2010).
41. **Delahaye, Sander, and Frédéric Lynen.**: Implementing stationary-phase optimized selectivity in supercritical fluid chromatography. *Analytical chemistry* **86.24**, 12220-12228 (2014).
42. **Lesellier, E.**: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by supercritical fluid chromatography (SFC). *Analusis*, **27.3**, 241-248 (1999).

発表論文

本学位論文に関する論文

- 1) **Sakai, M., Hayakawa, Y., Funada, Y., Ando, T., Fukusaki, E., & Bamba, T.:**
Development of a split-flow system for high precision variable sample introduction in supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1515**, 218-231 (2017).

- 2) **Sakai, M., Hayakawa, Y., Funada, Y., Ando, T., Fukusaki, E., & Bamba, T.:**
Development of a practical online supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry system with an integrated split-flow method. *Journal of Chromatography A*, **1592**, 161-172 (2019).

学会発表

- 1) 酒井美穂, 安部秋晴, 市来 弥生, 寺田英敏, 服部考成, 舟田康裕, 和泉自泰, 安藤孝, 福崎英一郎, 馬場健史
“残留農薬分析に資する新規スプリット方式オンライン超臨界流体抽出クロマトグラフシステムの開発”
第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015 年 6 月
- 2) Miho Sakai, Yoshihiro Hayakawa, Yasuhiro Funada, Yayoi Ichiki, Takashi Ando, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba
“Extension of practicality of SFE-SFC/MS by integrating a novel splitter”
SFC Asia 2017, 2017 年 7 月
- 3) Miho Sakai, Yoshihiro Hayakawa, Yasuhiro Funada, Yayoi Ichiki, Takashi Ando, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba
“Development of SFE-SFC/MS system by integrating a novel splitter”
SFC Rockville 2017, 2017 年 10 月
- 4) 酒井美穂, 早川禎宏 舟田康裕, 安藤 孝, 福崎英一郎, 馬場健史
“新規スプリットフローシステムを導入した SFE-SFC/MS の開発”
第 66 回質量分析討論会, 大阪, 2018 年 5 月
- 5) 酒井美穂
“SFE-SFC/MS のためのスプリットフローシステムの開発”
第 17 回 SFC 研究会, 宮崎, 2018 年 8 月
- 6) 酒井美穂, 早川禎宏 舟田康裕, 安藤 孝, 福崎英一郎, 馬場健史
“新規スプリットフロー法を用いた実用 SFE-SFC/MS システムの開発”
第 67 回質量分析討論会, 茨城県, 2019 年 5 月

謝辞

本博士論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻博士課程に在籍し行った研究成果をまとめたものです。

本博士研究を遂行するにあたり、「サイエンスとは…、社会を変えるような研究を」と、私がこれまで考えたことのなかった研究概念を教えて頂き、時には厳しく、時には温かいご指導を下さった、大阪大学大学院工学研究科 福崎 英一郎 教授に謝意を表します。

著者が本学大学院に入学し今に至るまで、ご指導や励まし、言葉では言い尽くせないほどの教育指導を頂き、自分の頭で考えて研究を遂行する力を授けてくださいました、九州大学生体防御医学研究所 兼 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 馬場 健史教授に心から感謝を申し上げます。

本論文作成にあたり、貴重なお時間を頂戴し、丁寧にご指導、ご助言、ご高覧を頂きました大阪大学産業科学研究所 永井 健治 教授、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 内山 進 教授に心から感謝を申し上げます。

また、貴重なご意見やご助言を頂きました、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 新間 秀一 准教授、並びに大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 小野比佐好 元助教に厚く御礼申し上げます。

著者の大阪大学大学院入学を誰よりも喜んで頂き、著者の意見を尊重する教育スタイルで育てて頂きました、宮崎県総合農業試験場 生産流通部 安藤 孝 元部長に感謝の意を表します。

本博士研究において、多大なるご助言やご指導を頂き、分析化学のいろはから教えていただきました、株式会社 島津製作所 早川 複宏 グループ長に心から感謝申し上げます。また、本研究に関してお世話になりました 株式会社 島津製作所の方々に合わせて感謝申し上げます。

著者之心の寄りどころであり、いつも親身に相談に乗って頂きました、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 市来 弥生 研究員に心から感謝申し上げます。

本研究に取り組むにあたり、多大なご協力とご支援を賜りました宮崎県総合農業試験場生産流通部 八代 賢 部長、戸高 隆 元部長、溝口 則和 元副部長、佐藤 美和 主任研究員、野上 麻美子 主任研究員、児玉 浩子 元非常勤職員、その他入学からこれまでの間に宮崎県総合農業試験場に所属された関係者の方々に心から感謝申し上げます。

また、大学生活を支えてくださいました、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域の緒先輩方、後輩の皆様に心から感謝の意を表します。

最後に、いつも温かく見守ってくれた主人と、笑顔で応援してくれた娘、時には著者に替わって家事を引き受けてくれた母や、それを許してくれた父、サポートをしてくれた友人に深い感謝の意を表し謝辞と致します。