

古くて新しい超臨界流体クロマトグラフィー



齋藤 宗雄



著者近影

1 はじめに

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は, Klesper らにより 1962 年, すなわち高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の出現以前に実現, 報告された¹⁾。しかし, SFC は, 不幸にもクロマトグラフィーの主流となることはできなかった。

なぜか? 1940 年代の Gordon, Martin と Synge による分配クロマトグラフィー²⁾をはじめとする, 種々の固定相の開発と理論の体系化により, 液体クロマトグラフィー (LC), ガスクロマトグラフィー (GC) の発展の基礎が出来上がっていたこと, 続いて Spackman, Stein, Moore らにより開発された LC 装置である自動アミノ酸分析計 (AA)³⁾が 1960 年代初めには市場に出回り, 生化学, 医学など多くの分野で盛んに用いられ始めたこと, GC 装置が石油化学研究に欠くべからざる機器として盛んに用いられ始めたことにある。それに対して, SFC が LC にも GC にもない圧力 (密度) による保持の制御という利点を持っていながら, 魅力ある応用分野を示すことができなかったということが挙げられよう。さらに 1970 年代に入り, HPLC が急速に発展し, 化学結合同型 C18 固定相カラムにより応用範囲が拡大したために⁴⁾, 同時期に発展期に入った SFC が影に隠れてしまったことがある。

しかし, 1960 年代, 70 年代, 80 年代には, 今日の SFC の基礎となった重要な研究がなされた。本稿では, これらを, 筆者自身のエピソードを交え振り返ってみたい。

2 1960 年代の研究と進歩

1962 年, Klesper, Corwin, Turner らによる初めての

SFC の報告は, “*High Pressure Gas Chromatography above Critical Temperatures*” というタイトルで, Communications to the editor といういわゆる短い速報でなされた。現在までに書かれた SFC に関するすべてのレビューは, この文献を引用することから始まっていると言って過言でない。しかし, 現在では, この報告を実際に読んだことがある読者は少ないだろうと思う。ちなみに, この報告は, 図 1 に示すように 2 ページに満たないごく短いものである。その中で, 彼らは, dichlorodifluoromethane ($T_c=112^\circ\text{C}$), monochlorodifluoromethane ($T_c=96^\circ\text{C}$) を用い, 圧力 800 psi (5.6 MPa) ~ 2300 psi (16.1 MPa) で porphyrin を polyethylene glycol 固定相で分離した。さらに, 彼らは, 「ポルフィリンは, 出口弁のところで回収することができた。」と述べ, すでに SFC による分取の可能性を予言していた。

Sie, Beersum, Rijnders らは, 1966 年から 1967 年にかけて “*High-Pressure Gas Chromatography with Supercritical Fluids*” というタイトルで *Separation Science* 誌上に一連の論文を発表した^{5)~8)}。これらの論文では, 二酸化炭素を用い, 種々の固定相との相互作用を理論的に考察し, 実験結果を示した。すでに GC, LC の理論があったといえ, この時期に, 流体-固 (吸着), 流体-液 (分配) クロマトグラフィーモデルを提案し, 実証しているのは, 特筆すべきことである。

Klesper らのグループは, 1968 年に新しい SFC 装置に関する論文⁹⁾を発表した。そこには, すでに流量と圧力を独立して制御できる装置が示され, また, 高压セルを備えたフィルター分光光度計が検出器として用いられている。同時期の HPLC 検出器は, 低圧水銀灯の 254 nm の輝線を用いた単一固定波長のものが主流であったことを考慮すると, 驚くべきことである。

当時は, 電子回路がようやく真空管からトランジス

Supercritical Fluid Chromatography: New Technology Based on Old Techniques.

After crystallization from acetone-petroleum ether (b.p. 60-70°) the material melted at 204-208.5°, $n_D^{20} +4.09$; $n_D^{20} +2.00$ (c 15.00); $n_D^{20} +2.02$ (c 15.00); $n_D^{20} +2.02$ (c 15.00). $d_4^{20} 1.065$. Calcd. for $C_{18}H_{24}O_4$: C, 71.10; H, 8.90. Found: C, 71.16; H, 8.65.

16 α -Hydroxytetraester (IV) from 16-tetraester (11). To a solution of 0.50 g (1.65 mmole) of 16-tetraester in 100 ml of ethanol, cooled to 4° in an ice bath, was added a solution of 0.10 g (2.48 mmole) of sodium borohydride in 5 ml of water. The resulting solution was allowed to stand at 0-5° for 1 hr. Then 1.00 ml of glacial acetic acid was added to decompose the excess sodium borohydride and the resulting solution was evaporated to dryness. Attempts at purification of the product by direct crystallization from dilute acetone, acetone-petroleum ether (b.p. 60-70°) and dilute acetone, gave material melting at 173.5-175°. Acetylation of this material (the material recovered from the mother liquor from the crystallization) (0.382 g, total) with acetic anhydride (5 ml) in pyridine (5 ml) yielded, after crystallization from dilute acetone, then acetone-petroleum ether (b.p. 60-70°), 204 mg of 16 α -hydroxytetraester (IV), m.p. 166-167°. A final crystallization from acetone-petroleum ether (b.p. 60-70°) gave material, m.p. 203-204.5°, $n_D^{20} +3.94$ (c 15.00), $n_D^{20} +2.02$ (c 15.00) (m.p. and infrared spectra) with that prepared above.

Hydrolysis of 153 mg of 16 α -hydroxytetraester diacetate (V) with 0.20 g of sodium hydroxide in 1 ml of water and 7 ml of methyl alcohol under nitrogen (room temperature, 18 hr.) gave, after crystallization from dilute methanol, 98.5 mg (95%) of 16 α -hydroxytetraester, m.p. 193-193.5°. After crystallization from dilute acetone, the material, m.p. 183-184.5°, proved to be identical in all respects (m.p. and infrared spectra) with that obtained directly from the formation.

16 α -Hydroxytetraester acetate was prepared by treating a solution of 16 α -hydroxytetraester (40 mg) in 5 ml of acetone with p-toluenesulfonic acid (0.10 g) for 18 hr. The acid was neutralized with solid potassium carbonate. The product was precipitated with water and crystallized from dilute acetone, m.p. 193.5-197°. $n_D^{20} +3.98$, $n_D^{20} +2.02$, $n_D^{20} +2.02$, $n_D^{20} +2.02$ (c 15.00). Calcd. for $C_{18}H_{24}O_4$: C, 71.10; H, 8.90. Found: C, 71.08; H, 8.93.

G. D. SARKIS AND CO.
P. O. Box 5119
Cortez, CO 81301

(11) R. A. Barker, R. J. Bourne, R. M. Finkler, and D. H. Walton, *J. Chem. Soc.*, 407 (1959); R. H. Heston and R. A. L. Wilson, *J. Chem. Soc.*, 1058 (1957).

Communications TO THE EDITOR

High Pressure Gas Chromatography above Critical Temperatures¹

Sir:

In studies on the separation of porphyrin mixtures by conventional gas chromatography, sufficiently high vapor pressures were reached only at temperatures where decomposition occurred. Higher vapor concentrations at lower temperatures are necessary for separations. For thermodynamic reasons liquids show higher vapor tension under pressure from insoluble gases.²⁻⁴ This increase is relatively small. Inorganic and organic solids,⁵⁻⁷ in-

cluding a derivative of chlorophyll,⁸ are soluble in carbon dioxide, ammonia, sulfur dioxide, ethanol, and ether far in excess of the thermodynamic increase in vapor tension. Solubility increases with pressure and van der Waals' interaction in the gas. Later the dissolution of polymers was found to be common.⁹

In our apparatus (see Fig. 1) the gas is contained in a pressure vessel and passed under 800 to 2300 p.s.i. pressure through a spiral of copper tubing for temperature equilibration, then through the chromatographic column which is made of glass, enclosed in a pressure tube and easily removable. The apparatus is mounted in an insulating box lined with heating foil. A propeller circulates the air. Thermocouples are inserted into the entrance of the column. In one modification a high pressure gauge glass was substituted for part of the pressure tube allowing visual inspection during runs. After applying the porphyrins and charging the pressure vessel the apparatus is heated above the critical temperature. Then the gas flow is started and the pressure raised to the desired level. The rate of flow is determined at ambient pressure with a pneumatic trough at the outlet.

(10) M. S. Booth and R. M. Ireland, *Chem. Rev.*, 44, 447 (1964).

(11) P. Ehrlich and R. D. Graham, *J. Polymer Sci.*, 45, 245 (1960).

著者が始めて目にした時、あまりに短く、簡単な報告に拍子抜けをした。ACSより許可を得て転載。

図1 Klesper らによる最初の超臨界流体クロマトグラフィーの報告 (文献1の全体の写真)

ターに移行しつつある時期で、背圧制御は、もちろんアナログのサーボシステムであったが、現在用いられている SFC システムの原型はすでに 40 年以上も前に完成していた。

Giddings, Myers, King らは、1969 年, “Dense Gas Chromatography at Pressures to 2000 Atmospheres”¹⁰⁾ という論文を発表した。その中で, ultra high-pressure gas chromatography の最も興味深い特徴の一つは, LC と統一が起こるだろうと言っていることである。「液体は, 気体の密度の 1000 倍であるが, 1000 気圧では, 気体分子が液体と同じように混み合っていて液体と同じような密度をしめす。このような密度では分子間力が強くなり, 固定相から大きな分子を引き出すことができる。これにより, 不揮発性の分子も揮発させる (筆者注: ガスクロマトグラフィーと言っているので揮発という言葉を用いているが, 現在の超臨界流体化学では, 超臨界流体に溶解するというのが普通であろう) ことができる。」と述べている。これについては, 後述するが, 1980 年代後半に Johnston¹¹⁾ や京都大学の梶本ら¹²⁾ が理論づけ, 実証している。

彼らは, また, Hildebrand の溶解度パラメーターを超臨界流体に拡張し, He, N₂, CO₂, NH₃ などを用い, 種々の化合物, プリン, ヌクレオシド, ヌクレオチド, ステロイド, 糖類, テルペン類, アミノ酸, タンパク, ワックスなどの保持挙動を調べた。

残念ながら, 彼らの予言した SFC と LC の統一は起

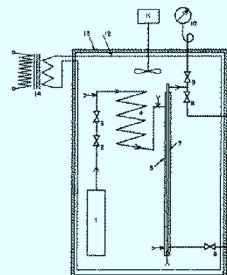


Fig. 1. High pressure gas chromatograph, schematic: 1, pressure vessel; 2, 3, 4, 5, valve; 6, spiral of copper tubing; 7, pressure vessel; 8, outlet valve; 9, chromatographic column; 10, gauge; 11, stirrer; 12, lining of heating foil; 13, heating box; 14, thermocouple; arrows indicate location of thermocouples.

To test the suitability of a gas for chromatography, a solution of 1-2 mg. of Ni(II)porphyrin II or etioporphyrin II was dried on glass beads and applied to the column packed with 60-80 mesh, untreated glass beads. In several experiments each with dichlorodifluoromethane, c.t. 112°, monochlorodifluoromethane, c.t. 98°, monochlorotrifluoromethane, c.t. 28.9°, trifluoromethane, c.t. 29°, and nitrogen at a maximum pressure of 2000 p.s.i. and 150-170°, only the first two gases removed the porphyrins from the column. Even the first gas showed no effect from 1-600 p.s.i. Above 1000 p.s.i. with the first and 1400 p.s.i. with the second, vaporization increased with increasing gas pressure. The porphyrins could be recovered at the outlet valve.

The column, 30 inches long, was packed with a stationary phase of 35% polyethylene glycol (Carbowax 20 M, Union Carbide) on Chromosorb W, 60-80 mesh, as inert support. (An experiment with Wadon alumina gave no movement, showing the need for the usual partition effect of gas chromatography.) A mixture of 1 mg. Ni(II)porphyrin II and 1 mg. Ni(II)etioporphyrin IX dimethyl ester dissolved in 0.2 cc. α -dichlorobenzene was applied to a plug of glass wool in front of the packing but not in contact with it. One typical experiment with dichlorodifluoromethane had these characteristics: 1800 p.s.i. at start, 1400 p.s.i. at time when valve to pressure vessel was closed, 50-150 cc./min. flow rate, 60 min. duration, release of pressure from 1600 p.s.i. at approximately 3000 cc./min., separated band

of Ni(II)etioporphyrin II was located 8 inches from the beginning of packing as measured from the center of band, width of band 3 inches, band of Ni(II)etioporphyrin IX dimethyl ester was located 3 inches from beginning, width 1 1/4 inches. X-ray powder patterns showed the components unchanged; recovery was nearly quantitative. The speed of development increased with pressure and flow rate. Monochlorodifluoromethane could be used in place of dichlorodifluoromethane but was weaker in solvent action at the same pressure. A polysaccharide (Harcos 370, Harchem Division) could be substituted for polyethylene glycol.

The increase in mobility with increasing pressure suggests still lower operating temperatures. Other compounds, including some of higher molecular weight, will be investigated.

Acknowledgment. We are very grateful to Mr. Joseph Walter for building the apparatus and for frequent help.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
BALTIMORE 18, Md.

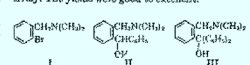
EDMUND KLESPIER
ALBERT H. COWEN
DAVID A. TERNER
SUNAT HOSSEINI
BALTIMORE 18, Md.

Received September 29, 1961

2-, 3-, and 4-Lithiobenzylidimethylamines. Grignard Reagent of 2-Bromobenzylidimethylamine¹

Sir:

Butyllithium in ether has often been used for lithium-halogen interchanges² and for metalations.³ We have observed that this reagent converts both 2-bromobenzylidimethylamine (I) and benzylidimethylamine (II) (room temperature) to a lithio derivative, which reacts with benzaldehyde and benzophenone to give carbinols II and III, respectively. The yields were good to excellent.



That I and benzylidimethylamine afforded the same carbinols was established by comparison of the infrared spectra of each carbinol obtained by the two processes and by the mixed melting

(1) Supported by the U. S. Army Research Office (Durham).
(2) R. G. Jones and H. Gilman, *Org. Reactions*, VI, 239 (1951).
(3) H. Gilman and J. W. Morton, *Org. Reactions*, VIII, 256 (1954).

こらなかったが、後年、名古屋大学の石井らが提唱した Unified Chromatography¹³⁾ の出現を予言したと言える。

余談になるが, 上記の水溶性化合物の分離には, アンモニアを用いている。アンモニアは, 非常に危険, 有毒なものなので, 現在市販されている SFC システムでは用いることはできない。

さらに余談となるが, J. W. King は, 米国農務省の研究者となり (現在は University of Arkansas 教授), 超臨界流体関連の学会には昔からよく参加しており, 筆者が米国現地法人に勤務していたころには (1998 年 9 月~2002 年 3 月), 個人的にも親しくなり, よく意見交換をしていた。彼によると, アンモニアの実験は二度とやりたくないとのことであった。2006 年に京都で開催された 8th International Symposium on Supercritical Fluids (第 8 回 ISSF)¹⁴⁾ で彼と再会し, 東北大学工学部の Smith 先生, その他, 内外の超臨界流体研究者とカラオケを楽しむ機会があったが, 彼はなかなかの歌い手だった。なお, King 先生は, 2012 年 5 月にサンフランシスコで開催される第 10 回の ISSF の組織委員長を務める。

3 1970 年代の研究と進歩

Jentoft と Gouw は, 1970 年, 圧力プログラムが可能 な SFC システムを発表した¹⁵⁾。彼らは, 圧力プログラムを用いて, 多環芳香族やポリスチレンを分離した。その中で, このクロマトグラフ装置は, High Resolution

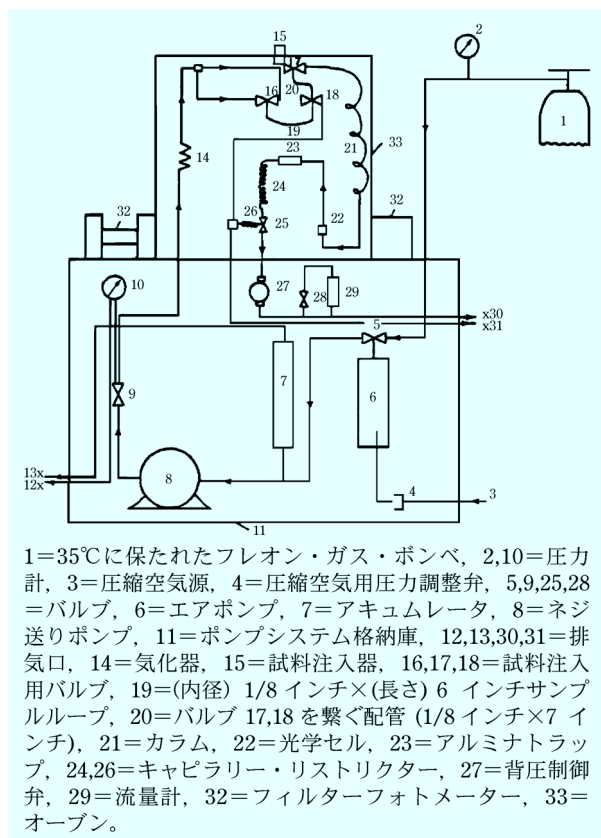


図2 Klesper らによる 1968 年に発表された SFC システム (文献 9 より, ACS より許可を得て転載)

LC (当時はまだ, High-performance Liquid Chromatography という用語が定着していなかった。)と基本的に同等の性能を持つと述べている。1970 年にすでにこのような高性能で精密な SFC 装置を開発したことは、驚くべきことである。なぜなら、その時期は、HPLC の揺籃期であり、定圧送液ポンプ、シリジポンプ、レシプロポンプでどれが良いかの論争が続いていた時期である。

さらに 1972 年、彼らは自動分画装置付の SFC、すなわち分取 SFC を報告している¹⁶⁾。図 3 に示す洗練されたフラクション・コレクションシステムが分取 HPLC の出現のずっと以前に開発されていたのである。

Jentoft には、二度、Gouw には一度会ったことがある。最初は 1989 年、Snow Bird で行われた Lee らが主催した SFC の学会の帰り、すでにリタイアしていた Jentoft に San Francisco の郊外の Santa Rosa のレストランで会い、SFC の現状を報告した。二度目は、後に述べる筆者らが編集した分取 SFC の本を贈呈するために San Francisco のレストランで Jentoft と Gouw に会った。出版社のミスで “Dedicated to Jentoft and Gouw” という献辞が “Dedicated to Jentoff and Gouw” と誤植されたことを詫言ると、「自分の名前はよく間違えられるが、これはよいほうで、Jump-off と言われたこともある。」と言ってくれたが、それは、気にしてい

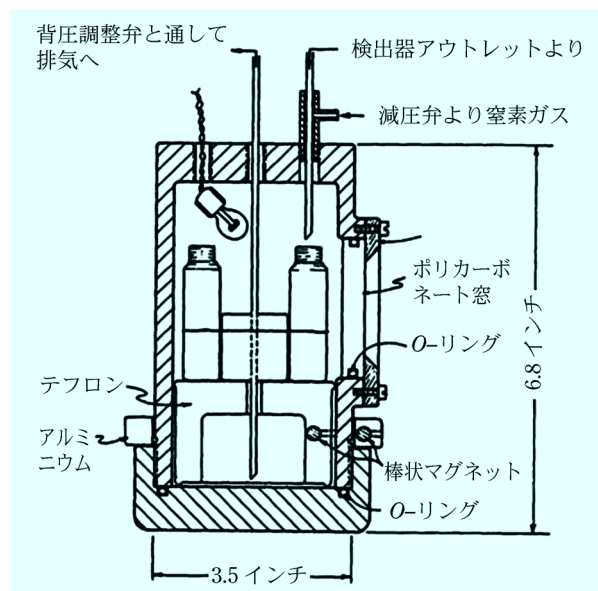


図3 Jentoft と Gouw による、加圧式、フラクションコレクター (文献 16 より, ACS より許可を得て転載)

ないというジョークであろう。

日本でも、1970 代に SFC に取り組んだ研究者がいた。日立中央研究所の藤田らは、早くも 1975 年には、日本で最初の SFC に関する報告を行っている¹⁷⁾。彼らは、Sie らの論文を引用しつつ、ガスクロマトグラフに液体用定流量ポンプを加え、背圧制御はニードルバルブで行った。移動相に、*n*-ヘキサンを用い、温度 250℃、圧力 17.5~51.0 kg/cm² で多環芳香族炭化水素を分離し、臨界点付近での分配係数を議論した。

SFC-MS

1977 年、Hartmann と Klesper は、“*Preparative Supercritical Fluid Chromatography of Styrene Oligomers*”¹⁸⁾¹⁹⁾ を発表し、フラクションを MS で分析した。

また、Randall と Wahrhaftig は、1978 年、“*Dense Gas Chromatograph/ Mass Spectrometer Interface*”²⁰⁾ というタイトルで SFC-MS を発表した。

これらの研究成果は、当時、液体を MS に導入することが困難であったことを考慮しても、LC-MS に先立つこと 10 年であったことは特筆すべきである。

Novotny, Bertsch と Zlatkis は、SFC における温度と圧力の効果を検討し、充填カラムでは、カラムの差圧が大きく密度勾配のためカラム効率が上がらないと主張した²¹⁾。

また、Bartmann と Schneider は、1973 年、SFC の物理化学的側面を研究した²²⁾。

1980 年、Klesper らの SFC 研究を含むヨーロッパの研究者の超臨界流体の基礎、応用研究をまとめた “*Extraction with Supercritical Gases*” という単行本²³⁾が Schneider, Stahl, Wilke らの編集により Verlag Chemie

社より出版された。

4 1980年代の研究と進歩

SFCにとって1980年代は、SFCとその関連技術の研究がもっとも盛んであった10年である。1980年代に入り、二酸化炭素は、安価、低毒性、引火性がないこと、臨界定数が $T_c=31.3^\circ\text{C}$ 、 $P_c=72.9\text{ atm}$ と、共に比較的安く扱いやすいことから、もっとも好まれる移動相流体となった。

また、この時期には、すでにコーヒー豆からの脱カフェインに代表される二酸化炭素を用いる超臨界流体抽出が工業的に実用化されていた。

中空キャピラリーカラム SFC

1981年、NovotnyとLeeらのグループが、充填剤を含まない中空キャピラリーカラム SFCを実現させた²⁴⁾。彼らは、内径 $50\text{ }\mu\text{m}$ のフューズドシリカチューブを用い、内面にコーティングしたdimethyl polysiloxaneなどを固定相としたカラムを用いた。中空キャピラリーカラムを用いることにより、充填カラムの差圧の問題が解決されるとした。彼らは、この技術をパテント化し、中空キャピラリーカラム SFC装置は、Lee Scientificから独占的に発売された。しかし、後に中空キャピラリーカラム SFC装置には、克服困難な技術的課題があることがわかった。

中空キャピラリーカラムでは、もっとも重要な操作パラメーターである圧力（密度）を、一定の流路抵抗を持つリストリクターと呼ばれる抵抗管を用い、流量を変えることにより、変化させており、流量と圧力を独立して制御することができなかった。このため、圧力（密度）を上げようとすると、流量を高く、すなわち高線速度を用いる必要があり、適切な圧力と線速度を両立することができなかった。また、標準検出器は、水素炎イオン化検出器（FID）であったため、FIDに大きな信号を与える有機溶媒はバックグラウンドが上昇するため、用いることが不可能であった。モディファイアーについては、検出器をUV検出器とし、あらかじめ液化炭酸ポンベ内に混合流体を貯蔵する方法などが検討されたが、保持を制御するため肝心の混合比を変える手法が限られたために、SFCの主流とはならなかった。また、極低流量送出を可能とするシリンジポンプを必要とした。しかし、1980代の一時期、特に米国では、多数の装置が販売され、SFCについて多くの誤解を与えてしまった。その誤解が払拭されたのは、1990年代半ばのことであった。

その間、ヨーロッパ、日本では、中空キャピラリーカラム SFCはあまり普及せず、主として充填カラム SFCの研究が進んだ。また、米国の一部の研究者も充填カラムの研究を進めた。これが、現在の充填カラム SFCシステムの隆盛に直接つながった。

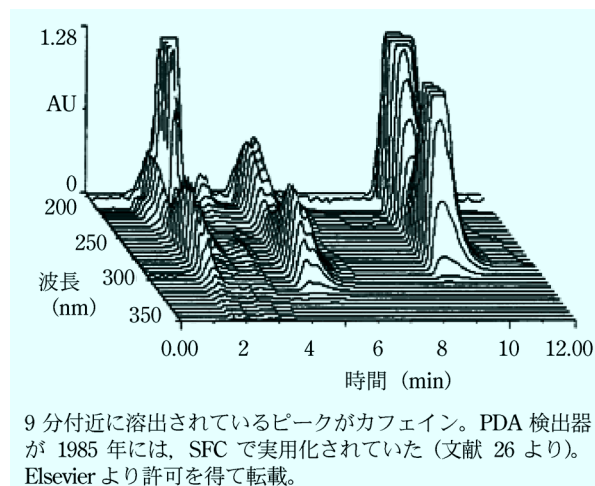


図4 ハイフェネーテド SFE-SFC システムによるコーヒーパウダーの分析

充填カラム SFC

中空キャピラリーカラムの出現以前は、すべての研究者は、充填カラムを用いていた。1982年 Gere, BoardとMcManigillは、Hewlett-Packard (HP) のHPLC装置をSFC装置に改造し、 $3, 5, 10\text{ }\mu\text{m}$ の充填剤を用い、SFCではHPLCより高いカラム効率を得られること、特に、高流速領域で顕著であることを示した²⁵⁾。HPはこのSFCシステムを商品として販売したが、後にBerger Instrumentにこのビジネスを売却した。その後、^{うよきよくせつ}紆余曲折を経て、Thar、そして現在では、Watersの事業の一部になっている。

1985年、森永製菓研究所の杉山と筆者らは、SFE/SFCハイフェネーテド・システムを開発し、コーヒー豆からカフェインをSFE抽出、直接導入SFC分離を行い、PDA検出器でモニターした²⁶⁾ (図4)。

現代のSFC装置でもっとも重要なデバイスは、流量に無関係に圧力を制御できる圧力制御装置 (BPR) である。筆者らは、電子的に圧力を制御できる分析、分取、抽出用BPRを開発した²⁷⁾。後に、これを用いたSFEとSFC装置を日本分光が販売を開始した。

新薬開発競争が激しさを増す中、ハイスループット分離システムが必要欠くべからざるものとなり、SFCが実用的な高速分離装置としてしだいに脚光を浴びるようになった。

1987年夏、イギリスのLoughborough Universityにおいて、Roger M. Smithの主催により、SFCのワークショップが初めて開催され、ヨーロッパ、アメリカ、日本から講師が集まり、SFCの実用化について活発な討論とデモが行われた。日本分光とLee Scientificが装置を提供した。内容としては、HPLCシステムの充填カラムSFC装置への改造法 (R. M. Smithら、Saitoら)、中空キャピラリーカラムと充填カラムの比較 (P. J. Schoenmakers)、SFC-MS (D. E. Gamesら、S. J.

Lane), SFE/SFC (Saito ら) などである。

これらの講演内容は、1988年にRoyal Society of Chemistryのmonographシリーズより、“Supercritical Fluid Chromatography”というもののずばりのタイトルでSFCに関する初めての単行本として出版された²⁸⁾。

このワークショップは、筆者個人にとって最も思い出深いものであった。イギリスの電源電圧（当時は240 VAC、現在はイギリスを含めたヨーロッパ全域で230 VACとなっている）に合うよう電源電圧を変換したはずだったが、背圧制御装置の電源電圧変換に問題があったらしく、電源を入れたとたん、圧力制御のバルブ駆動ソレノイドが焼けてしまった。日本に電話をし、電気図面をファックスしてもらい、いろいろ調べたところ、ソレノイドだけではなく、駆動用のトランジスターも焼損していることがわかった。明日は講演とデモがあるのだが、どうしようと頭を抱えてしまった。ところが、代理店のサービス担当者が、焼けたソレノイドを分解し、「よし、コイルを巻きなおそう。」と、筆者を彼らのワークショップに連れて行ってくれた。そこの職人さんはマイクロメーターで線径を計り、巻数を数えながら焼けたエナメル線を解き、またたくまに修理してしまった。その間、彼らのやり取りを聞いていたが、まったく聞き取ることができず、サービス担当者に英語から英語の通訳をお願いする始末であった。これが、イギリスのClass Dialectというものかと実感する次第であった。それにしても、壊れた機械は修理して長く使うというイギリスの良き伝統には驚嘆した。さて、ソレノイドが直ったなら、回路を直さなければならないということになったが、プリント版回路の修理など、もう何年もやったことがなく、まずは、焼けたトランジスターの代替品を入手することから始めた。大学には、装置の修理のワークショップがあり、そこの主任の方が大変親切で、代替品のトランジスター互換表を見て探してくれ、提供してくれたのみならず、必要な道具、場所を貸してくれた。プリント版と回路図をにらめっこし、ようやく全体を把握し、なにをどうすれば良いかがわかったのは、明け方の3時であった。それから、トランジスターを交換し、恐る恐る電源を入れるとソレノイドがカチンと音を立てた。各テストポイントの電圧を測り、正常であることを確認した。会場が開くのを待って装置につなぎ、二酸化炭素を流すと無事、圧力を制御した。筆者の講演は午後だったので、講演の聴講を失礼して仮眠することにした。

講演も無事終え、講演の中で話したコーヒーからの香氣成分とカフェインの抽出、レモンピールオイルの抽出の実演を行った。Lee Scientificからも装置が出展されていたが、そちらもなにか問題が発生したらしく、実演を行うことができず、担当者が悔しがっていた。この日

の夜は、なるほどこれがイギリスの大学かと思わせられた石造りの大きなホールでバンケットが行われた。筆者も講師の一人としてSmith, Games, Lee, Bartleら錚々たる先生方に交じりハイ・テーブルに座らされた。食事の終わりに、デザートに入る前に、Smithがテーブルを灰皿でカンカンと叩き”Now, you may smoke.”と言ったのもいかにもイギリスの大学という感じがした。もちろん、どこもかしこも禁煙の現在では、ありえないことだろう。

余談となるが、Loughboroughは、筆者は、最初のghはサイレントで、ローボローと発音されるものと思って、そのように発音していたところ、正しくは、ラッフボローだと教わった。この綴りからその発音を想像するのは、我々には不可能と思う。

キラル SFC

1985年、SFCによるキラル分離は、Mourierらにより、自作のSFC装置を用いて初めて実現、報告された²⁹⁾。1986年、東京薬科大学の原と筆者らは、市販のSFC装置（SFC-100）を用いて、*d-l*-アミノ酸誘導体を分離した³⁰⁾。

1986年、PerrutとJusforguesは、内径60 mmのカラムを用いた分取SFC（Prep-SFC）を開発した。SFC装置は、高圧ガスシステムであり、高価なものなので、付加価値の高いエッセンシャルオイルやキラル医薬品に適していると述べている³¹⁾。

1980年代に、名古屋大学の岡本らは、非常に高性能のキラル分離カラムを開発し、その広範囲な応用性について一連の報告をした³²⁾³³⁾。この技術は、後にダイセル化学で商品化され、1990年代に入り、LC, SFCによるキラル分離分析、分取が実用的なものとして急速に普及した。

International Symposium on Supercritical Fluids

Perrutは、1988年、第一回のInternational Symposium on Supercritical Fluids (ISSF)をフランスの保養地、ニースで開催した。このシンポジウムは、高圧相平衡から超臨界抽出、クロマトグラフィーまで、超臨界流体に関するすべての分野を網羅する大きなもので、ニースという場所柄もあって世界中から大勢の参加があった³⁴⁾。筆者は、ミラノにあるJASCO Europeに行き、そこからMazzola博士の車でニースまで地中海沿いの道路を走ったが、天気も良く、フランス映画に出てくるような海と山々、その間に点在する家並み、その風景は息を呑むような美しさであった。

日本からは、東京薬科大学の原先生が組織委員の一人として参加し、超臨界二酸化炭素を移動相に用いたSFCによるキラル分離を発表した³⁵⁾。また、筆者はPerrutからの依頼でレモンピールオイルのSFEと分取

SFCに関する講演を行った³⁶⁾。そのほかには、工学系の先生方が大勢参加されていた。このシンポジウムで知己を得た先生方には、その後も長くご指導を頂くことになった。

余談になるが、バンケットは、確か Le Negresco というホテルの Salon Royal という豪華なシャンデリアのあるホールで行われた。豪華な装飾がある歴史的建物なので、全面禁煙であったが、まだ喫煙者が多かった時代でもあり途中でタバコを吸いに退席する人も多かった。一方、フランス人の参加者の中には、このホールのステータスを良く知っている人たちも多く、タキシードを着ている人もいた。

1987 年、88 年にイギリス、フランスで行われた超臨界流体に関する国際会議に刺激されたのか、1989 年 6 月中旬にアメリカユタ州 Snow Bird で Lee らの主催によりシンポジウム・ワークショップが開催された³⁷⁾。

1989 年に続き、1991 年 1 月に第二回のシンポジウムがユタ州のスキーリゾート Park City で開催された³⁸⁾。このシンポジウムは、ホテルで合宿という趣のもので、夜遅くまで議論が続いた。筆者は、電子式の圧力調整弁を用いた充填カラムによる分取の話をしたが、多くの米国人研究者は、背圧制御はリストリクター（抵抗管）でするものと思っており、流量に独立して圧力を制御することが可能だということを理解してもらうのに苦労した。その後、しばらくの間、米国では背圧制御装置が Backpressure regulator ではなく、Variable restrictor と呼ばれた。

余談となるが、なか日の 1 月 16 日の夜だったと思うが、ブッシュ大統領(父)の重大発表があるということで、参加者の大半が早々にホテルの部屋に戻った。豊橋技術科学大学の神野先生とヘルシンキ大学の Riekkola 先生と町に食事に出たが、通りには、ほとんど人がいない状況だった。そのうち、大きなサイレンが鳴り響き、何事だろうと持っていたラジオをつけたところ、多国籍軍がバクダッドの空爆を開始したというニュースだった。第一次湾岸戦争の始まりだったのだ。

クラスター理論

1980 年代後半から 1990 年代に、化学工学の分野で超臨界流体の溶媒としての特性の研究が盛んに行われた。超臨界流体クロマトグラフィーを理解するために有用と思われる代表的な例を紹介したい。

1987 年、Kim と Johnston は、溶質の回りの超臨界流体分子の部分濃度がバルクのそれよりも高いことを、種々の流体中の phenol blue の UV スペクトルシフトを用いて示した¹¹⁾。

京都大学の梶本らは、CHF₃ の超音速ジェットや超臨界流体の種々の条件下で、溶質 DMAN の回りに取り込まれる CHF₃ 分子の数が一定に変化することを示し

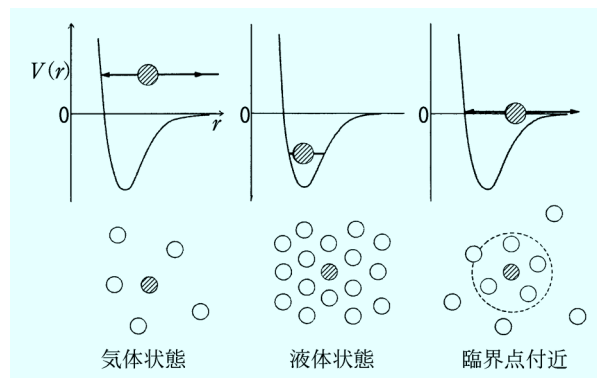


図5 “分子間力”と“分子のもつエネルギー”からみた状態の違い（文献 39 より）

た¹²⁾。また、図5に示すように超臨界流体中の溶質が流体と溶媒和を作る様子をわかりやすく説明した³⁹⁾。

5 1990 年代の研究と進歩

装置技術的には、かなり成熟したものとなり、実用的な応用の研究が盛んになり、実用的応用を促すいくつかの単行本も出版された。

筆者らのグループでは、装置技術、応用技術をまとめた単行本をたくさんの先生方の協力を得て、1994 年、VCH より出版した⁴⁰⁾。

また、A. Klaus と C. Berger (Berger Instrument の創始者 Terry Berger とは別人で、Perrut のグループに属していた) は、Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns を 1998 年に出版した⁴¹⁾。

分取 SFC

前述のように 1986 年には、Perrut と Jusforgues は、内径 60 mm のカラムを用いた分取 SFC (Prep-SFC) を開発した³¹⁾。

Perrut らの分取 SFC は、生産用ともいえる大規模なものだったものに対し、筆者らは 1995 年に 20 mm の内径のカラムを用いる実験室規模の分取 SFC を開発し、フォトダイオードアレー (PDA) 検出器を用いた Stacked Injection によるキラル分取 SFC の例を示した⁴²⁾。

大阪大学の右手らは、PMMA オリゴマーの SFC 分取を行い、各重合度ごとに分画し、それらの NMR や熱分析を行った。全く分散のないものを得ることは、当時、画期的なことだった⁴³⁾。

SFC における現在の移動相

表 1 は、超臨界流体を語る時に度々示される、滝蔭、舩岡らによる純物質の気体、液体、超臨界流体の密度、拡散係数、粘性である⁴⁴⁾。そして、表 2 は、種々のクロマトグラフィーモードにおける操作パラメータの有用性を示したものである。SFC では、圧力、温

表 1 気体, 液体, 超臨界流体の密度, 拡散係数, 粘性

物性	単 位	気体 1 気圧, 25 °C	液体 1 気圧, 25 °C	超臨界流体	
				T_c, P_c	$T_c, 4P_c$
密度	ρ (g cm ⁻³)	$0.6\text{--}2\times 10^{-3}$	0.6–1.6	0.2–0.5	0.4–0.9
拡散係数	D_m (cm ² s ⁻¹)	$1\text{--}4\times 10^{-1}$	$0.2\text{--}2\times 10^{-5}$	$0.5\text{--}4\times 10^{-3}$	$0.1\text{--}1\times 10^{-3}$
粘性	η (g cm ⁻¹ s ⁻¹)	$1\text{--}3\times 10^{-4}$	$0.2\text{--}3\times 10^{-2}$	$1\text{--}3\times 10^{-4}$	$3\text{--}9\times 10^{-4}$

滝島繁樹, 舩岡弘勝らによる文献 44 より。

表 2 種々のクロマトグラフィーモードにおける操作パラメーターの有用性

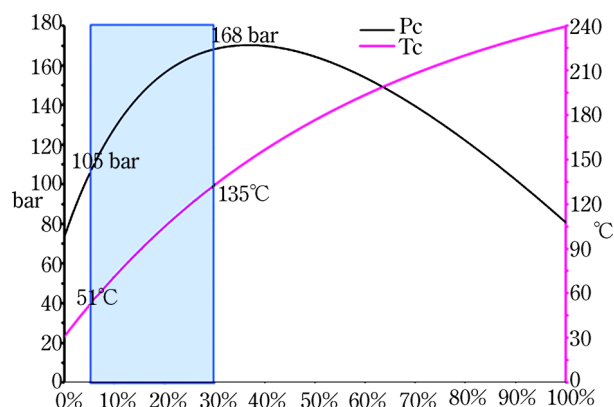
パラメーター \ モード	GC	SFC	LC
圧 力	不可	可能	不可
温 度	可能	可能	可能
モディファイアー	不可	可能	可能

度, モディファイアーすべてで保持挙動を制御でき, しかもこれらに勾配をつけること (グラジエント法) が可能なので優れていると喧伝^{けんでん}された。このため, Supercritical Fluid Chromatography が Super Chromatography と誤解を受けるもととなった。しかし, 現在では, これらの表をそのまま適用するには問題がある。なぜなら現在では, 二酸化炭素単独で移動相に用いることはまれで, 多くの場合数 % から数十 % の有機溶媒をモディファイアーとして添加する。この場合, 図 6 に示すように臨界圧力も温度も急激に高くなり, 通常の操作条件では, そのような二成分系流体は超臨界流体とはならず, 液化炭酸と有機溶媒の混合溶媒となるため, 普通の LC により近くなる⁴⁵⁾。したがって, 圧力や温度で保持を大きく変化させるためには, それに見合った圧力, 温度が必要となるが, 現在ではそのような条件が用いられることは少ない。最初に大量の有機溶媒を液化炭酸に混合し移動相として用いたのは Olesik らで, 彼女らはその移動相が超臨界流体ではないことをはっきり認識しており, “super-fluidity mobile phase” と呼んだ⁴⁶⁾。

微粒子充填剤を用いた, 超高速 SFC

Novotny ら²¹⁾ や Schoenmakers ら⁴⁷⁾ は, 微粒子充填剤を用いた充填カラム SFC では, カラム差圧が増大し, カラム上端では密度が高く, 下端に行くに従い密度が低くなるので, 移動相の溶出力が上端では高くしだいに低くなる, 逆グラジエント状態となるのでカラム効率の改善には限界があるとした。

これは, 二酸化炭素のみを用いた場合には, 適応されるであろうが, 現在のように, 数 % から数十 % のモディファイアーを添加する SFC では, 問題にならない。なぜなら, 前節で述べたように有機溶媒をわずかに



齋藤, 新田のプログラム (文献 45) により計算

図 6 CO₂-MeOH 系の臨界圧力と温度の混合比 (質量比%) との関係

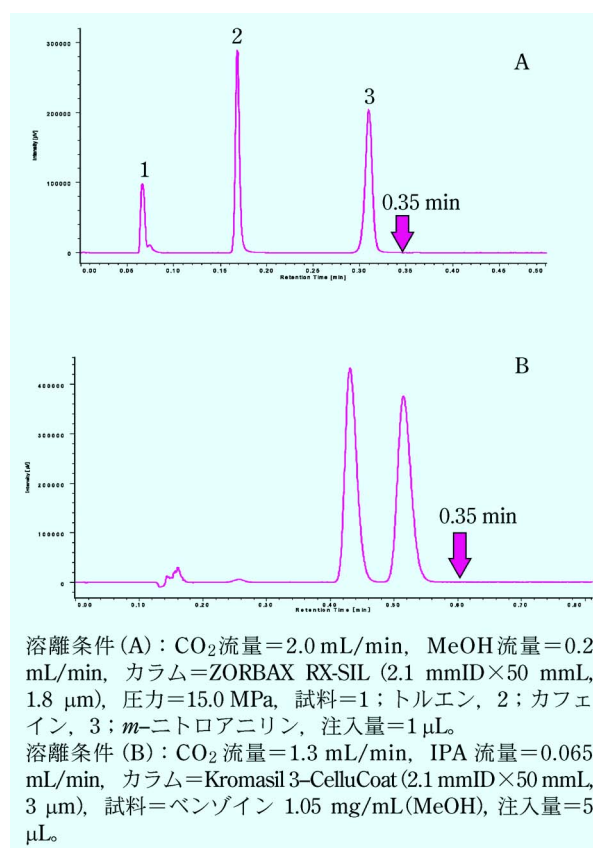


図 7 SFC による超高速分離の例 (A : アキラル分離, B : キラル分離)

加えるだけで, 臨界定数は大きく上昇し, 現在の通常の溶離条件では, 亜臨界, または, 単なる液化炭酸と有機溶媒の混合溶媒であるので, 密度は大きく変化しないからである。したがって, 厳密には SFC とはいえない状態にある。そのため, 微粒子充填剤を用いても, 超高性能 LC (UHPLC) のような挙動をする。以下に筆者らの未発表データを示す⁴⁸⁾。

たくさんの研究者・技術者の努力により, ほんの 15 年前までは, あまり省みられることもなかった SFC であるが, 生き残り, 特にキラル分離, 分取には欠くべか

らざるものとなった。また、最近では、その高速性、環境にやさしいという側面から Green Chemistry の一翼を担うものとして、SFC の応用範囲を積極的に広げようという研究が盛んである。

また、MS の利用も実用的となった。キラル分析には、円二色性 (CD) 検出器の利用も可能となった。これらの技術は、分取対象物を不純物から正確に区別ために欠かせないものとなりつつある。

6 2000 年代の研究と進歩

1960 年代、70 年代、80 年代、90 年代を振り返って見ると、SFC には何度か飛躍するチャンスがあったにもかかわらず、実際に分離手法の一つとして確立され、商業的にも成り立つようになったのは、1990 年代も終わりか 2000 年代に入ってからである。2002 年、Harris は、*Analytical Chemistry* 誌の Product Review “The SFC Comeback” のなかで NIST の Karen Phinney にインタビューした時、彼女は「私が、1995 年に NIST に入った時に、HP の SFC があり、私は SFC をやります。と、言ったことに対して先輩研究者の一人は、あの Science Fiction Chromatography をやるの? と言われた。」と語っている。筆者もインタビューを受け、「最初に市販された中空キャピラリーカラム SFC に期待を裏切られたユーザーの懐疑心を払拭するのに長い時間が掛かってしまった。」と述べた⁴⁹⁾。

7 おわりに

SFC は、一時期、当時の HPLC を上回る完成度の高い装置が開発されたにもかかわらず、普及に至るには、21 世紀まで待たなければならなかった。一部メーカーの SFC のマーケティング戦略が多くのユーザーを混乱に陥れ、SFC が Science Fiction Chromatography と揶揄されるに至ったが、その偏見を払拭するのに長い年月を要したのは、残念なことである。

また、HPLC の歴史を振り返ると、応用に対する要求がカラムと装置の開発の原動力となった。残念ながら SFC では、そのような駆動力は、最近まで働かなかったと言える。しかし、1990 年後半にようやく SFC が真に力を発揮できる応用、すなわちキラル分離、分取が見つかり、これが駆動力としてカラム、装置の開発を促し、さらに応用範囲を広げる要求が新しい固定相の開発につながった。しかし、日本国内の状況を見ると、装置が高圧ガス保安法の対象となるため、装置そのものも維持費も高価となり、またそのために組み込むことができない技術等もあり、諸外国にくらべて、研究者にとっても、装置メーカーにとっても圧倒的に不利な立場となっている。

わが国の研究者も SFC 技術の開発に大きく貢献したにもかかわらず、この技術が、国内では用いることが容

易ではなく、海外で積極的に応用されている現状を見ると複雑な思いがする。分析機器の国内の市場規模を見れば、一家電量販店の売り上げにも満たない小さなもので、世界の市場規模でさえその 10 倍はないだろうが、分析機器は科学技術研究のマザーツールであり、これがないと、基礎科学も応用技術から生まれる医薬品、医用機器、食料、肥料、プラスチック、半導体、車、船舶、航空機等々、すべての工業製品の研究開発も滞る。分析化学の装置技術、応用技術が、共にわが国で健やかに発展し、世界の科学・技術の発展、そして人々の健康で幸福な社会の実現に大きく貢献することを祈りつつ筆を置くこととする。

付記 本稿では、レビュー部分の人名は、通常の「ぶんせき」執筆要領に従った。エピソード部分は、状況にあわせ適宜、敬称などを付した。

文 献

- 1) K. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner : *J. Org. Chem.*, **27**, 700 (1962).
- 2) A. H. Gordon, A. J. P. Martin, R. L. M. Synge : *Biochem J.*, **7**, 79 (1943).
- 3) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore : *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 4) J. J. Kirkland : *Chromatographia*, **8**, 661 (1975).
- 5) S. T. Sie, W. Van Beersum, G. W. A. Rjinders : *Sep. Sci.*, **1** (4), 459 (1966).
- 6) S. T. Sie and G. W. A. Rjinders : *Sep. Sci.*, **2** (6), 699 (1967).
- 7) S. T. Sie, G. W. A. Rjinders : *Sep. Sci.*, **2** (6), 729 (1967).
- 8) S. T. Sie, G. W. A. Rjinders : *Sep. Sci.*, **2** (6), 755 (1967).
- 9) N. K. Karayannis, A. H. Corwin, E. W. Baker, E. Klesper, J. A. Walter : *Anal. Chem.*, **40**, 1736 (1968).
- 10) C. G. Giddings, M. N. Myers, J. W. King : *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 277 (1969).
- 11) S. Kim, K. P. Johnston : *Ind. Eng. Chem. Res.*, **26**, 1206 (1987).
- 12) O. Kajimoto, M. Fukunani, T. Kobayashi, K. Yamasaki : *J. Phys. Chem.*, **92**, 1347 (1988).
- 13) D. Ishii, T. Niwa, K. Ohta, T. Takeuchi : *J. High Resolut. Chrom.*, **11**, 800 (1988).
- 14) 8th International Symposium on Supercritical Fluids, KYOTO (Japan) 5–8 November 2006.
- 15) R. E. Jentoft, T. H. Gouw : *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 138 (1970).
- 16) R. E. Jentoft and T. H. Gouw : *Anal. Chem.*, **44**, 681 (1972).
- 17) 藤田一紀, 下河辺伊久夫, 中島史登 : 日本化学会誌, **8**, 1948 (1975).
- 18) E. Klesper, W. Hartmann : *J. Polym. Lett. Ed.*, **15**, 9 (1977).
- 19) W. Hartmann, E. Klesper : *J. Polym. Lett. Ed.*, **15**, 713 (1977).
- 20) L. G. Randall, A. L. Wahrhaftig : *Anal. Chem.*, **50**, 1705 (1978).
- 21) M. Novotny, W. Beartch, Zlatkis : *J. Chromatogr.*, **61**, 17 (1971).

- 22) D. Bartmann, G. M. Schneider : *J. Chromatogr.*, **83**, 135 (1973).
- 23) G. M. Schneider, E. Stahl, G. Wilke, Eds.: “*Extraction with Supercritical Fluid*”, (1980), (Verlag Chemie, Weinheim).
- 24) M. Novotny, S. R. Springton, P. A. Peaden, J. Fjeldsted, M. L. Lee, *Anal. Chem.*, **53**, 407A (1981).
- 25) D. R. Gere, R. Board, D. McManigill : *Anal. Chem.*, **54**, 736 (1982).
- 26) K. Sugiyama, M. Saito, T. Hondo, M. Senda : *J. Chromatogr.*, **332**, 107 (1985).
- 27) M. Saito, Y. Yamauchi, H. Kashiwazaki, M. Sugawara : *Chromatographia*, **25**, 801 (1988).
- 28) Roger M. Smith, Ed.: “*Supercritical Fluid Chromatography*”, RSC Monograph Series, (1988), (Royal Society of Chemistry, Letchworth).
- 29) P. A. Mourier et. al.: *Anal. Chem.*, **57**, 2819 (1985).
- 30) S. Hara, A. Dobashi, K. Kinoshita, T. Hondo, M. Saito, M. Senda : *J. Chromatogr.*, **371**, 153 (1986).
- 31) M. Perrut, P. Jusforgues : *Entropie*, **132**, 3 (1986).
- 32) Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada : *Chem. Lett.*, **1984**, 739.
- 33) Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada : *J. Chromatogr.*, **363**, 173 (1986).
- 34) Proceedings of International Symposium on Supercritical Fluids, Nice, France, October 17–19, 1988.
- 35) S. Hara, A. Dobashi, Y. Dobashi, M. Saito, Y. Yamauchi : Proceedings of International Symposium on Supercritical Fluids, Nice, France, October 17–19, 475, 1988.
- 36) Y. Yamauchi, M. Saito, T. Hondo, M. Senda, J. L. Millet, E. Castiglioni : Proceedings of International Symposium on Supercritical Fluids, Nice, France, October 17–19, 503, 1988.
- 37) Symposium/Workshop on Supercritical Fluid Chromatography, Snow Bird, UT, June 13–15, 1989.
- 38) Symposium on Supercritical Fluid. Chromatography. 15–17 January, 1991. Park City, UT, USA.
- 39) 梶本興亜 : 化学, **47**巻, 7号 (1992).
- 40) M. Saito, Y. Yamauchi, T. Okuyama, Eds.: “*Fractionation by Packed-Column SFC and SFE*”, (1994), (VCH, New York).
- 41) A. Klaus, C. Berger, Eds.: “*Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns*”, Chromatographic Science Series Vol. 7 (1998), (Marcel Dekker Inc).
- 42) M. Saito, Y. Yamauchi, “Preparative supercritical fluid chromatography and its applications to chiral separation”, Hatano and Hanai, Eds., Int. Symp. Chromatogr., 35th Anniv. Res. Group Liq. Chromatogr., pp. 863–866 (1995).
- 43) K. Ute, N. Miyatake, T. Asada, K. Hatada : *Polym. Bull.*, **28**, 561 (1986).
- 44) 滝島繁樹, 舩岡弘勝, 化学工学物性定数, **11**, 31 (1989).
- 45) M. Saito, T. Nitta, M. Saito, Y. Yamauchi, T. Okuyama, Eds.: “*Fractionation by Packed-Column SFC and SFE*”, pp. 27–62, (1994) (VCH, New York).
- 46) Y. Cui, S. V. Olesik : *Anal. Chem.*, **63**, 1812 (1991).
- 47) P. J. Schoenmakers, L. G. M. Uunk : *Chromatographia*, **24**, 51 (1987).
- 48) Unpublished data by the author’s group, 2008.
- 49) C. M. Harris : *Anal. Chem.*, **87A**, February, (2002).

● 齋藤宗雄 (Muneo SAITO)

日本分光株式会社 (〒192-8537 東京都八王子市石川町 2967-5)。東北大学理学部卒。理学博士 (東京都立大学)。《現在の研究テーマ》分取超臨界流体クロマトグラフィーの高性能化, クロマトグラフィーにおけるピークバンドの広がり最小化。《主な著書》“*Fractionation by Packed-Column SFC and SFE*”, (編著) (VCH)。《趣味》フライフィッシング。

新刊紹介

ナノ融合による先進バイオデバイス

民谷栄一 監修

近年, 科学技術のフロンティア領域として, ナノテクノロジーに関する研究が加速し, その動向に注目が集まっている。本書は, 化学, 物理学, 生物学, 薬学, 医学, その他, 広範の分野における最新のナノマテリアルやナノデバイスを紹介し, 酵素, タンパクレセプターなどの生体機能材料との融合によ

り, バイオセンサーやバイオチップに関連したナノバイオデバイスへの研究に関する最新情報を提供している。第1章～第4章では, ナノマテリアル, ナノバイオテクノロジー, ナノファブリケーション, ナノフォトニクスなど, ナノバイオデバイスの要素技術を詳説し, 第5章～第14章では, 生体材料, 診断薬, 生物剤, 環境などへの応用技術を本格的な実用性の観点から最新の研究動向と合わせて紹介する構成になっている。本書で取り上げられている技術の多くは, 実用化に向けての将来性が期待されるものばかりで, 更なる技術の進展や改善のための有意義な情報源としても必携である。ナノ融合によるバイオデバイスの技術革新と最先端の研究動向を網羅的に把握できる本書は, 多くの研究者の方に読んでいただきたい一冊である。

(ISBN 978-4-7813-0487-8・B5判・267ページ・68,000円+税・2011年刊・シーエムシー出版)