

# ぶんせき

別刷

No. 5

1988

---

## 超臨界流体クロマトグラフィー

前田 恒昭・保母 敏行

社団法人 日本分析化学会

東京都品川区西五反田 1 丁目 26 番 2 号 五反田サンハイツ 304 号

## 超臨界流体クロマトグラフィー



前田 恒昭  
保母 敏行

### 1 はじめに

超臨界流体クロマトグラフィー (supercritical fluid chromatography, 以下 SFC) は、1962年 Klesper ら<sup>1)</sup>による創始までさかのぼることができる。その後の発展は主として装置的な問題により発展が遅れていたということができよう。

SFC が盛んに研究されるようになったのは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の進歩と関係がある。すなわち、臨界圧力以上に移動相を加圧するためのポンプと耐圧セルをもった紫外吸収検出器 (UV 検出器) が入手できるようになったこと、また、カラムには、シリカゲルや化学結合相をもった充てん剤を詰めた HPLC 用のカラムがそのまま利用できるようになったことが挙げられる。一方、温度を臨界点以上に加熱するにはガスクロマトグラフィー (GC) 用の恒温槽が利用できる。

そこで 1980 年代初頭には、二酸化炭素あるいはヘキサンを移動相とし、充てんカラムと UV 検出器を組み合わせたものがよく使われた。HPLC を SFC へ改造することは UV 検出器のセルの窓材 (石英) を厚くし、カラム出口圧力を高めるために、バックプレッシャーバルブを付け、カラムを恒温槽に入れて加熱できるようにすることで実現できる。

本誌で SFC が本格的に取り上げられたのは 1985 年の藤田による解説<sup>2)</sup>が最初である。ここでは SFC の基本的装置、分離条件、応用例などが詳しく解説されている。

SFC の特徴は移動相の大きな溶解力、早い分離にあり、熱不安定物質、高分子量物質の分析に有効であることである。最近では水素炎イオン化検出器 (FID)、質量分析計 (MS)、あるいは赤外吸収検出器 (IR) の利用

が実用化ないしは実用可能になりつつあり、定性、定量の両面で利用価値が高くなっている。

本稿は JICST による 1984.01 から 1987.12 までの検索を行い、選択入手した文献を中心とし、更にそれ以前の関連文献と 1987 年末までに入手し得た文献を基に、主として装置的な進歩をまとめたものである。

なお、SFC に関する総説には Peaden ら<sup>3)</sup>、石井ら<sup>4)</sup>、Gere<sup>5)</sup>、Fjeldsted ら<sup>6)</sup>、Chester<sup>7)</sup>、Lee ら<sup>8)</sup>、Greibrokk ら<sup>9)</sup>、その他のものがある。また、1986 年の *Anal. Chem.* では Fundamental Reviews の gas chromatography のところで扱われている。

### 2 SFC の理論

SFC では GC あるいは LC と比べてより複雑な分離条件が設定できる。すなわち、固定相、移動相の種類と組成、分離温度のほかに、分離圧力 (移動相密度) によっても分離の様子が変わってくる。そこで、これら因子が保持値に与える効果についての検討が数多くなされている。また、van Wasen ら<sup>10)</sup>による SFC の物理化学的原理と応用についての総説も参考になる。Peaden ら<sup>11)</sup>はキャピラリーカラム SFC での圧力効果、口径、圧力プログラム、試料導入、検出などについての理論的処理を行っている。Chester ら<sup>12)</sup>はキャピラリーカラム SFC において GC 的分離と LC 的分離の両特性があることを  $\log k'$  と  $1/T$  の関係から熱力学的解析により示した。Wilsch ら<sup>13)14)</sup>は移動相密度の効果を理論的に解析し、保持値の計算が可能なることを示した。更に、Schoenmakers ら<sup>15)16)</sup>は充てんカラムにおける圧力、密度、温度プロフィルの同時計算式をカラムの多数点での熱バランス式を解くことにより導いている。

一方、神野ら<sup>17)</sup>は、多環芳香族炭化水素に関する既存の保持データから未知多環芳香族炭化水素の保持値を推定する手法について検討を行い、良い実験結果を得て

Supercritical Fluid Chromatography.

Tsuneaki MAEDA 電気化学計器㈱

Toshiyuki HOB0 東京都立大学工学部

表1 超臨界流体の物性<sup>8)</sup>

流体	双極子 モーメント (debyes)	$T_c$ (°C)	$P_c$ (atm)	$\rho_c$ (g/ml)	$\rho_{400}$ atm (g/ml)
CO <sub>2</sub>	0.00	31.3	72.9	0.47	0.96
N <sub>2</sub> O	0.51	36.5	72.5	0.45	0.94
NH <sub>3</sub>	1.65	132.5	112.5	0.24	0.40
n-C <sub>5</sub>	0.00	196.6	33.3	0.23	0.51
n-C <sub>4</sub>	0.00	152.0	37.5	0.23	0.50
SF <sub>6</sub>	0.00	45.5	37.1	0.74	1.61
Xe	0.00	16.6	58.4	1.10	2.30
CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	0.17	111.8	40.7	0.56	1.12
CHF <sub>3</sub>	1.47	25.9	46.9	0.52	

$T_c$ : 臨界温度,  $P_c$ : 臨界圧力,  $\rho_c$ : 臨界点での密度,  $\rho_{400}$ : 400気圧, 換算温度1.03での密度

いる。

### 3 移動相と分離条件

前述のように, SFCではGCあるいはLCと比べてより複雑な分離条件が設定できる。最近では各因子を単独に, あるいは組み合わせて複数を变化させるグラジエント法がマイクロコンピューターとの結合で容易に行えるようになってきた。分離の難しい試料の取り扱いに効果的である。Schmitzら<sup>18)</sup>は最近グラジエント法について総説を書いている。

さて, 移動相の選択は分離ばかりでなく, 検出にも関係してくるため重要である。SFCで現在最も多く利用されている移動相は二酸化炭素とn-ペンタンであろう。両者とも無極性移動相である。前者はいろいろな検出器と組み合わせて利用できるところからよく使われている。

このほかの移動相としてはプロパン, ブタンなどの炭化水素, 一酸化二窒素, アンモニア, フロン, 六フッ化硫黄, ジエチルエーテルなども使われている。Kueiら<sup>19)</sup>はキャピラリーカラムでのアンモニアの利用を検討し, 極性化合物の分離に有効であること, n-オクチルまたはn-ノニルポリシロキサン固定相が安定に組み合わせることを示した。アンモニアは最も極性が強い移動相である。一方, 一酸化二窒素は二酸化炭素より少し極性が強い。Schwartzら<sup>20)</sup>は六フッ化硫黄をマイクロボアカラムの移動相として使い, ガソリン成分のグループ分離を行い, FID検出ができることを示した。Novotnyら<sup>21)</sup>は数種の移動相を比較検討し, IR検出器を使う場合, キセノンの有効なことを報告している。表1には一般に使える移動相に関する特性を示した。

前述のように, 二酸化炭素とn-ペンタンともに無極

性であるために, 特にHPLC用のシリカゲルをベースとする充てん剤を用いたSFCで極性成分を溶離する際には充てん剤の吸着性が現れる。そこで極性のある物質をモディファイヤーとして添加する必要がある。Levyら<sup>22,23)</sup>は二酸化炭素を移動相とする場合のモディファイヤーとしてメタノール, エタノール, テトラヒドロフラン, アセトニトリル, 六フッ化硫黄などについて検討し, 保持値, 選択性あるいはピーク形への効果を報告している。樋口ら<sup>24)</sup>, Mourierら<sup>25)</sup>も種々の固定相-モディファイヤー系について検討し, 残存シラノール量の効果やモディファイヤーの種類と濃度の効果を報告している。Blilieら<sup>26,27)</sup>をはじめモディファイヤー濃度を変化させるグラジエント分離法の検討例は多数ある。

一方, キャピラリーカラムでは溶融シリカ表面の吸着性が小さいため, 検討例は少ない。Wrightら<sup>28)</sup>は二酸化炭素への水やメタノール添加がフェノール, n-トリヤコンタンその他の成分の保持値へ及ぼす効果について検討し, 充てんカラムと違ってほとんど効果のないことを報告している。これに対し, Fieldsら<sup>29)</sup>も二酸化炭素への2-プロパノール, ジクロロメタン, アセトニトリルの添加効果について検討し, 保持値の減少と選択性に対する効果を報告している。

## 4 カラム

### 4.1 充てんカラム

HPLC用の充てん剤が利用可能である。Gereら<sup>30)</sup>は10, 5, 及び3 $\mu$ mのODSカラム(4.6mm $\times$ 10~25cm)について移動相密度とlog  $k'$ の関係を32~100°Cの間で検討し, 粒子が細かいほど分離効率が向上することを示した。Schwartz<sup>31)</sup>は, 短い充てんカラムが比較的やさしい分離の場合には最適であることを他のカラムとの比較から結論している。

特異な充てん剤として, Ecknigら<sup>32)</sup>はモレキュラーシーブ5Aを使いアイコサンまでのパラフィン類を20~200°C, 20MPaまでのプログラミングにより分離している。また, Macaudiereら<sup>33)</sup>は $\beta$ -シクロデキストリン結合シリカゲルを合成し, これを充てんしたカラムにより光学活性アミド類やホスフィンオキシド類を, Mourierら<sup>25,34)</sup>, Haraら<sup>35,36)</sup>もシリカゲルに光学活性アミノ酸誘導体を化学結合した充てん剤を利用し, アミノ酸その他の光学分割を行っている。

### 4.2 キャピラリーカラム

充てんカラムを他の検出器, 例えばFIDや質量分析計とつなごうとするとき, 扱いにくいところは出口流量

が大きいことである。そこで GC では一般的であるが、HPLC ではまだ実用的でない溶融シリカキャピラリーカラム (fused silica capillary column, FSCC) で、GC 用よりも内径の小さな 100  $\mu\text{m}$  以下のものが利用される。

ポリシロキサン系固定相液体を表面に化学結合した FSCC はシラノール基が少ないため吸着性も少なく、また溶解力の大きい超臨界流体によっても流出せず、中空であるため圧力ドロップも小さく、高い理論段数のものが得られるという好ましい性質をもっている。ただし試料導入法、高感度、高選択性検出器など多くの問題はあ

る。現在ではこの FSCC が主流となってきている。Lee ら<sup>37)</sup> によるキャピラリーカラム SFC の現状と将来に関する議論は、これらの点について多くの示唆を与える。キャピラリーカラムはほとんどすべての場合、溶融シリカキャピラリーチューブの内面にポリシロキサン系固定相液体を化学結合させたものである。Kong ら<sup>38)</sup> は SE-33、SE-54 などを固定化した内径 25~100  $\mu\text{m}$  の FSCC の作り方を報告している。これらを GC と SFC に適用比較し、GC での分離効率 (理論段数) が約 5 倍良いことを示した。Kuei ら<sup>39)</sup>、Ogden ら<sup>40)</sup> も固定相の固定化法を報告している。SFC では移動相の溶解性が大きいので固定相の固定化は GC のものより強固にする必要がある。Novotny ら<sup>41)</sup> は固定相が膨潤することを報告、注意を喚起している。Kong ら<sup>42)</sup> はキャピラリー内面の不活性化について幾つかの方法を比較検討している。

ポリシロキサン以外の固定相として Rokushika ら<sup>43)44)</sup> は液晶を固定相液体として使い、多環芳香族炭化水素の分離に効果があることを示した。

キャピラリーチューブの中に HPLC 用小粒径充てん剤を充てんしたマイクロパックドカラムの利用も Hirata ら<sup>45)46)</sup>、Takeuchi ら<sup>47)</sup> により報告されている。Hirata ら<sup>45)</sup> は最高分子量が 7000 を超えるポリスチレンオリゴマーを 10  $\mu\text{m}$  のシリカゲル充てんマイクロパックドカラム (0.2 mm  $\times$  58 cm, 理論段数 8000 段) を使って良好に分離している。

なお、FSCC の完成には固定相の安定性の確保、流量制御法、試料の定量的導入法などの確立が不可欠である。

## 5 検出器

超臨界流体を用いて分離した後検出器に導く方法として、i) 超臨界流体としたままで導く、ii) 検出器の直前まで超臨界状態にしておく、iii) カラムを出たら液体状態にする、の 3 通りが考えられる。i)、ii) が主に使われているが、セルの耐圧性が悪い場合には iii) も考慮されねばならない。通常、UV あるいは IR 検出器の場

表 2 カラムと検出器の組み合わせ

検出器 <sup>†</sup>	充てんカラム (80 報)	キャピラリーカラム (87 報)
UV	48 報	9 報
FID	7	36
MS	4	15
IR	8	6
FLD		7
TID		2
FPD		1
IMS		2
光散乱	1	
化学発光		1

† 略号は本文参照

合 i) の方法が利用されている。水素炎イオン化検出器、質量分析計などの場合は ii) が利用されている。

表 2 は調査した文献の中で使われている検出器の種類と例数を、それらが組み合わせられて使われているカラムの種類に従って集計したものである。

### 5.1 UV 検出器

従来の HPLC 用 UV セルの石英窓の厚さを厚くすることで耐圧性を容易に増すことができるため、充てんカラムを使う際に多用されてきた。今日、UV-VIS の領域で使用のできる検出器、更にはフォトダイオードアレイ検出器が入手可能である。使用例として、Jinno ら<sup>17)</sup> はジゼル排出粒状物質中の多環芳香族炭化水素の同定にフォトダイオードアレイ検出器を活用している。

一方、キャピラリーカラムを利用する際にはよりセル容積の小さいものが必要となる。最近、溶融シリカチューブを利用したセルを使ったオンカラム検出が容易に行えるようになってきた。

### 5.2 水素炎イオン化検出器 (FID)

FID は有機化合物一般に対し検出感度が高く、検量線の直線領域も広いため、利用価値が高い。SFC では熱不安定な物質や高沸点物質が扱われるが、それらを水素炎中に適度な流量で凝縮、固化することなく送り込めることが重要となる。そのため、カラムと FID とを結ぶためのインターフェースとして、炎へ入る直前に圧力を急降下させ、移動相ごと噴出させるための機構 (レストリクター, restrictor) の研究が必要である。Guthrie ら<sup>48)</sup> は内径 50  $\mu\text{m}$ 、外径 375  $\mu\text{m}$  の溶融シリカチューブの先端を焼き丸めた後、先端から平らに紙やすりで削って約 1  $\mu\text{m}$  の穴をあけたレストリクターを開発し、成果を挙げている。また、Lee ら<sup>37)</sup> は内径 25~50  $\mu\text{m}$  の溶融

シリカチューブの先端に多孔質焼結層を詰めたレストリクターを開発、利用している。Chester ら<sup>49)~51)</sup>はロボットを用いてレストリクターを作り、ポリグリセロールエステルなどの分析に利用している。Bally ら<sup>52)</sup>はテーパーの付いたレストリクターと一定径をもつレストリクターについて理論と実際の両面から検討し、テーパーの付いたもののほうが優れていると報告している。また、Smith ら<sup>53)</sup>はレストリクターから移動相が噴出膨張する過程を観察し、温度調節の重要性を指摘している。移動相温度が臨界温度 ( $T_c$ ) を超えると生成する液滴が  $0.2 \mu\text{m}$  以下となり、換算温度 ( $T/T_c$ ) が 1.3 以上になると無視できる大きさになることを明らかにしている。

なお、言うまでもないが、FID に応答する移動相の使用はできない。水、ギ酸をモディファイヤーとして使った例も報告されている<sup>23)54)</sup>が、二酸化炭素がモディファイヤーなしで利用されている例が多い。

一方、前述した Schwarts ら<sup>20)</sup>は耐食性がある FID が用意できれば  $\text{SF}_6$  が利用できることを、また Lundanes ら<sup>55)</sup>は石油のグループ分離に関し、 $\text{CO}_2$  と  $\text{N}_2\text{O}$  の比較をし、 $\text{N}_2\text{O}$  を使った場合バックグラウンドが  $\text{CO}_2$  より 3 けた大きいことを報告している。

### 5.3 質量分析計 (MS)

GC-MS に見るように、MS との結合も要求が強い。多くの研究実施例が報告されている。FID の場合と同様、レストリクターの使用が必要となる。また、通常、化学イオン化法によるスペクトルがとられる。これは EI 法ではクラスターイオンを生じやすいからである。SFC-MS では Smith ら<sup>56)~58)</sup>の多くの研究報告がある。最近、図 1 に示すようなイオン源のリペラー電極の後ろをメカニカルポンプ吸引する方法を開発し、ガス流量が高められ、バックグラウンド、イオン化効率、感度の改善ができたことを報告している。例えば、ピロリジンアルカロイドを  $1\sim 3 \text{ ng}$  の検出下限で測定している。

Matsumoto ら<sup>59)</sup>は LC-MS 用に開発された真空噴霧インターフェースを利用し、ヘキサン-エタノール系移動相、ODS-Q3 ( $30\sim 50 \mu\text{m}$ ) 充てんマイクロパックドカラム ( $0.5 \text{ mm} \times 70 \text{ cm}$ ) を  $260\sim 280^\circ\text{C}$  で使って分離したスチレンオリゴマーなど幾つかの試料の検出に利用している。

また、Crowther ら<sup>60)</sup>は種々の充てんカラムと MS を組み合わせてコデイン、カフェインなどの数十~数百 pg 領域での検出を行っている。

Zaugg ら<sup>61)</sup>はクラスターイオンによる感度の低下、CI と EI の混じったスペクトルを与えるとされる EI 法の改

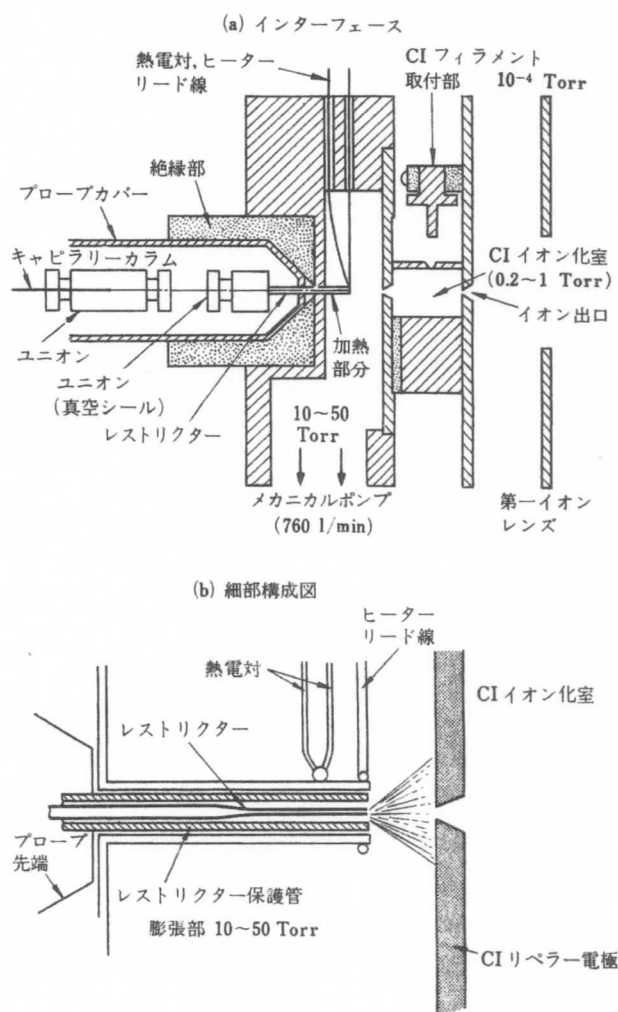


図 1 MS への接続例<sup>56)</sup>

善を試みているが、加熱温度を高めることが必須のようである。

一方、Berry ら<sup>62)</sup>は移動ベルト式 HPLC-MS 用インターフェースを利用し、キサンチン、スルホンアミド、ステロイドなどを EI 法及び CI 法で検出している。質量分析計としては 4 重極質量分析計の利用が多いが、FT-MS の使用例<sup>63)64)</sup>もある。

なお、メタノールを 10%  $\text{CO}_2$  に添加した移動相を使ってアルカロイドの SFC-MS 分析をしている例<sup>60)</sup>もあるが、MS 検出におけるモディファイヤーの効果について更に検討がなされる必要がある。

SFC-MS の総説には Wright ら<sup>65)</sup>のものが参考になる。

### 5.4 赤外線吸収検出器 (IR)

IR 検出器についてはその測定手法を 2 種類に分けることができる。

第 1 の方法は、UV セルの場合と同様、耐圧性の窓をもったフローセルを使う方法である。第 2 の方法は、

KClあるいはKBrのような赤外透明物質をカラム出口で移動させながら移動相を吹きつけて溶出成分を採取し、TLCにおいてデンストメーターでクロマトグラムを得るようにIR吸収を測定、クロマトグラムあるいはスペクトルを得る方法である。どちらの方法にも大きな問題点がある。前者では移動相が測定波長において吸収帯をもっているためにセルの光路長を短くしなければならず、感度に問題を生ずることである。後者では移動相の揮発性が試料成分のそれよりずっと大きくなければならないこと、クロマトグラムがリアルタイムで得にくいことである。

**5.4.1 フローセル方式** Shaferら<sup>66)</sup>はSFCの検出器として最初にFT-IRを適用した。CO<sub>2</sub>を移動相として利用している。彼らはCO<sub>2</sub>の赤外透過性について圧力との関係から調べ報告している。CO<sub>2</sub>は667 cm<sup>-1</sup>, 2350 cm<sup>-1</sup>付近, 3650 cm<sup>-1</sup>付近に強い吸収を、また1200~1400 cm<sup>-1</sup>の間にFermi共鳴による吸収をもっている。CaF<sub>2</sub>窓をもった光路長1 cmのフローセルを使い、アニソール、アセトフェノン、ニトロベンゼンについて3 μgあればS/Nの良いスペクトルがとれるとしている。Hughesら<sup>67)</sup>もCO<sub>2</sub>のIR透過性についてその圧力依存性を調べ、低圧のほうが透過性が高いことを報告している。Hughesらは後述するように、窓材としてZnSeを使い、芳香族カルボニルの検出下限として500 ng以下と報告している。Jordanら<sup>68)</sup>は移動相としてフロン23とCO<sub>2</sub>とを比較し、フロン23が4000 cm<sup>-1</sup>から2500 cm<sup>-1</sup>で透明であり、CO<sub>2</sub>と相補的に使えることを報告している。一方、Olesikら<sup>21)69)</sup>は各種移動相の検討に基づき、その赤外透過性からキセノン移動相として使うことを勧めている。1 ngの2,6-tert-ブチルフェノールを検出している。キセノンは高価であるが、キャピラリーカラムの場合その消費量はわずかであることから、今後一般的に利用されることが予想される。

前述のOlesikら<sup>21)69)</sup>は窓材にGeを、Jordanら<sup>68)</sup>はZnSeを使っているが、これより前Hughesら<sup>67)</sup>は窓材としてGaAs, As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, ZnSe, ZnSについて検討し、強度、赤外透過性、入手しやすさなどの観点からZnSeの利用を勧めている。Johnsonら<sup>70)</sup>はZnSe窓を使用する高圧光パイプフローセルを製作し、各種化合物(270 μg以上)の定性に充分利用できるスペクトルを得ている。

**5.4.2 溶媒除去方式** LC-IRにおいて使われている手法であるが、これをSFCに最初に導入したのはShaferら<sup>71)</sup>である。彼らはその後改良発展させ<sup>72)</sup>、ガラスの上にKCl粉を敷き(4 mm×2 mm×25 cm)、これを一定速度で動かし、そこへレストリクターからCO<sub>2</sub>-

メタノール(95:5)とともに溶出する成分を吹きつけて捕集後拡散反射法でIR吸収測定にかけ、クロマトグラムを得ている。キノン類に適用し、UV検出法と比較している。分離度が少し落ちるがS/Nはむしろ優れていた。

Jinnoら<sup>73)</sup>はバッファメモリ法と呼ぶ手法をスチレンオリゴマー、メチルフェニルポリシロキサンを検出に適用している。マイクロパックドカラムからn-ヘキサン-エタノール(9:1)とともに溶出した成分をKBr結晶板の上に約1 mmの幅で析出させ、IR測定する方法である。スペクトル、クロマトグラムともに繰り返し測定可能という特徴がある。

Pentonyら<sup>74)75)</sup>はZnSe板を使っている。微小領域に付着したngレベルの多環芳香族炭化水素、キノンなどを検出している。

なお、SFC-IRに関してはJinnoによる総説<sup>76)</sup>に詳しい。

## 5.5 蛍光検出器 (FLD)

高感度、選択的検出器として発展、利用されつつある検出器にFLDがある。UVオンカラム検出器に見た測定系について少しの変更で蛍光検出が可能である。Fjeldstedら<sup>77)</sup>は走査型蛍光検出器の、またGluckmanら<sup>78)</sup>はフォトダイオードアレイ利用検出器の試作をしている。

## 5.6 その他の検出器

以上の検出器のほかに、Westら<sup>79)</sup>はGC用熱イオン化検出器(TID)に内径5 μmのレストリクターを介してキャピラリーカラムをつなぎ20 pgのp-ニトロフェノールを検出している。Markidesら<sup>80)</sup>は炎光光度検出器(FPD)をSFCの特性に合わせて改良した2段フレーム型とし、CO<sub>2</sub>を移動相とした場合のパラチオンの検出下限25 ng(S mode)及び0.5 ng(P mode)を得ている。Carraudら<sup>81)</sup>は充てんカラムにつないだレストリクターから移動相を噴霧、蒸発させる光散乱検出器を利用し、各種化合物を数十ngの感度で検出している。これらのほかイオン移動度検出器<sup>82)83)</sup>、化学発光検出器<sup>84)</sup>などの利用が検討されている。なお、SFC用検出器に関してはNovotnyによる総説<sup>85)</sup>がある。

## 6 ポンプ

移動相の送液にはHPLC用のポンプが一般に用いられている。SFCではCO<sub>2</sub>のような液化ガスを安定に供給し、圧力(密度)を制御するためにポンプには特別な注

意が必要である。プランジャーポンプを用いる場合、加圧時の気化を防ぐため、ポンプヘッドの冷却(0℃以下)が必要であるが、Greibrokkら<sup>86)</sup>はチェック弁の追加と冷却でピークの再現性、保持の再現性が増すと報告している。更に、シリンジポンプとの比較を行い、FIDのノイズレベルにより送液の安定性を調べた。その結果、キャピラリーカラムに適する微小流量(100 μl/min以下)ではシリンジポンプが優れているが、ポンプへの充てん時にピストンを冷却しなければならないこと、充てんに時間がかかることなどから充てんカラム用の送液はプランジャーポンプでも充分であると結論している。

Porterら<sup>87)</sup>はシリンジポンプにCO<sub>2</sub>を充てんする方法としてヘリウムで加圧して充てんする方法と、ピストン部を冷却して充てんする方法を比較し、ヘリウムがCO<sub>2</sub>とともに送られると保持の再現性が悪くなるので、冷却して充てんする方法が良いと報告している。

このほかに、Parienteら<sup>88)</sup>はコンピューター制御の空気圧増幅式のポンプをキャピラリーカラム用の送液に用い、シリンジポンプより良い性能を得ている。このポンプは定流量送液を目的として作られたHPLC用ポンプに対し、定圧力送液に向いておりSFCに適するとのことである。

## 7 試料の導入法

充てんカラムを使う場合にはHPLC用の試料導入器がそのまま流用できることから、あまり問題はない。ただし、試料を溶媒に溶かして導入することが多いが、溶媒の選択に注意しないと分離に影響が出ることが考えられる。

一方、キャピラリーカラムの場合には、スプリットあるいはスプリットレス導入法がとられる。通常、60~200 nlのサンプルループをもった高圧バルブを使い、溶媒に溶かした試料を導入する。しかし、75 nl以上を導入するときはスプリットする必要があると報告されている<sup>37)</sup>。現在60 nlの内容積をもったものは入手可能である。

スプリット法はスプリット比とピーク面積に直接関係がないこと、スプリット比が圧力の影響を受けることなどが知られている。Jacksonら<sup>89)</sup>は図2に示すような試料導入系を作り、耐圧サンプルバイアル中で超臨界ペンタンにピレンを溶解した後バルブ系(ループ容積0.2 μl)からキャピラリーカラムへ導入する方法を検討している。スプリット比を変えて6回導入したときの標準偏差を求め、ジクロロメタン溶液として導入した場合の結果と比較し、超臨界流体に溶かしてスプリット導入したほ

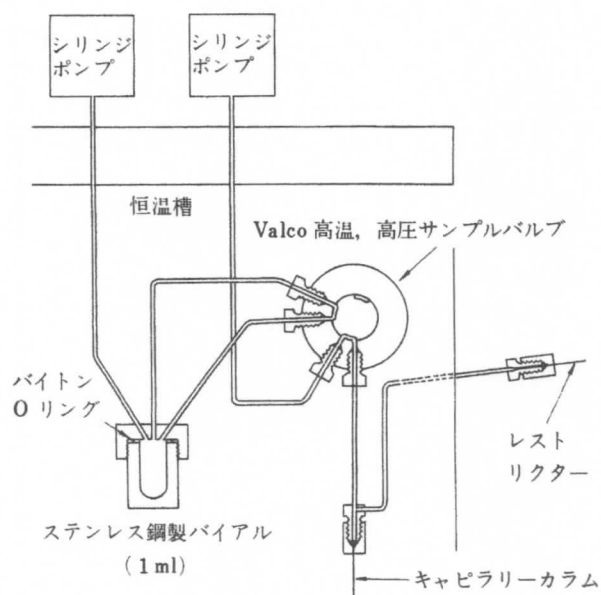


図2 超臨界状態での試料導入法の一例<sup>89)</sup>

うが再現性が良いことを明らかにしている。

さて、溶液として導入する場合、試料が室温で溶媒に溶けることが必要である。しかし、一般的に超臨界流体の溶解性は室温における溶媒のそれよりずっと大きい。そこで前記Jacksonら<sup>89)</sup>の手法やGmuerら<sup>90)91)</sup>、あるいは充てんカラムを使っているが、Skeltonら<sup>92)</sup>や斎藤ら<sup>93)</sup>の手法が抽出効果も含まれて有効となる。

## 8 応用

従来の充てんカラム、UV検出器を使うSFCに加え、昨年より我が国でもキャピラリーカラム用の装置が市販されるようになった。これらの装置を利用した分析例はしだいに増えている。Schwartz<sup>31)</sup>はSFCの応用分野を、i) 工業分野、ii) 生化学分野、iii) 化石燃料のタイプ分析の三つに分けているが、実際に対象とされた成分は多岐にわたる。詳しくはWhiteら<sup>94)</sup>の総説その他を参照されたい。

マルチディメンショナルクロマトグラフィーあるいはカラムスイッチング法と呼ばれる方法も試みられている。Christensen<sup>95)</sup>はNH<sub>2</sub>カラムとODSカラムの2本の充てんカラムを組み合わせ、CO<sub>2</sub>移動相を使ってコールタール成分の細かな分離に適用している。Levyら<sup>96)</sup>はSFCとGCを組み合わせ炭化水素の良好な分離を得ている。

一方、SFCを分取用に使った例として、Campbellら<sup>97)</sup>、Nishiokaら<sup>98)</sup>の多環芳香族化合物への適用例がある。

## 9 ま と め

以上, 80年代に入ってから目覚ましく発展をしているSFCの様子を見てきたが, 今後, 分析用としてはキャピラリーカラムあるいはマイクロパックドカラムの利用がますます増えるものと考えられる。それに伴い, 試料の導入法, 固定相, 検出法をはじめとする幾つかの問題点の解決が望まれる。一方, 分取用としてあるいはオンラインプロセス分析用としても有効に利用されることが期待される。

## 文 献

- 1) E. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner : *J. Org. Chem.*, **27**, 700 (1962).
- 2) 藤田一紀 : ぶんせき, **1985**, 847.
- 3) P. A. Peaden, M. L. Lee : *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 179 (1982).
- 4) 竹内豊英, 石井大道 : “高分解能クロマトグラフィー”, 化学の領域増刊 138号, p. 59 (1983).
- 5) D. R. Gere : *Science* (Washington, D. C.), **222**, 253 (1983).
- 6) J. C. Fjeldsted, M. L. Lee : *Anal. Chem.*, **56**, 619 (1984).
- 7) T. L. Chester : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 226 (1986).
- 8) M. L. Lee, K. E. Markides : *Science* (Washington, D. C.), **235**, 1342 (1987).
- 9) T. Greibrokk, B. E. Berg, A. L. Blilie, J. Doehl, A. Farbrod, E. Lundanes : *J. Chromatogr.*, **394**, 429 (1987).
- 10) U. van Wasen, I. Swaid, G. M. Schneider : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 575 (1980).
- 11) P. A. Peaden, M. L. Lee : *J. Chromatogr.*, **259**, 1 (1983).
- 12) T. L. Chester, D. P. Innis : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 561 (1985).
- 13) A. Wilsch, G. M. Schneider : *J. Chromatogr.*, **357**, 239 (1986).
- 14) K. H. Linnemann, A. Wilsch, G. M. Schneider : *J. Chromatogr.*, **369**, 39 (1986).
- 15) P. J. Schoenmakers : *J. Chromatogr.*, **315**, 1 (1984).
- 16) P. E. Schoenmakers, P. E. Rothfusz, F. C. C. J. G. Verhoeven : *J. Chromatogr.*, **395**, 91 (1987).
- 17) K. Jinno, T. Hoshino, T. Hondo, M. Saito, M. Senda : *Anal. Chem.*, **58**, 2696 (1986).
- 18) F. P. Schmitz, E. Klesper : *J. Chromatogr.*, **388**, 3 (1987).
- 19) J. C. Kuei, K. E. Markides, M. L. Lee : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, 257 (1987).
- 20) H. E. Schwartz, R. G. Brownlee : *J. Chromatogr.*, **353**, 77 (1986).
- 21) S. B. French, M. Novotny : *Anal. Chem.*, **58**, 164 (1986).
- 22) J. M. Levy, W. M. Ritchey : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 503 (1985).
- 23) J. M. Levy, W. M. Ritchey : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 242 (1986).
- 24) 樋口 彰, 小林英吾, 保母敏行, 鈴木繁喬, 前田恒昭 : 第48回分析化学討論会講演要旨集, p. 251 (1987).
- 25) P. Mourier, P. Sassiati, M. Caude, R. Rosset : *J. Chromatogr.*, **353**, 61 (1986).
- 26) A. L. Blilie, T. Greibrokk : *Anal. Chem.*, **57**, 2239 (1985).
- 27) A. L. Blilie, T. Greibrokk : *J. Chromatogr.*, **349**, 317 (1985).
- 28) B. W. Wright, R. D. Smith : *J. Chromatogr.*, **355**, 367 (1986).
- 29) S. M. Fields, K. E. Markides, M. L. Lee : *J. Chromatogr.*, **406**, 223 (1987).
- 30) D. R. Gere, R. Board, D. McManigill : *Anal. Chem.*, **54**, 736 (1982).
- 31) H. E. Schwartz : *LC-GC*, **5**, 14 (1987).
- 32) W. Ecknig, H-J. Polster : *Sep. Sci. Technol.*, **21**, 139 (1986).
- 33) P. Macaudiere, M. Caude, R. Rosset, A. Tambute : *J. Chromatogr.*, **405**, 135 (1987).
- 34) P. A. Mourier, E. Eliot, M. H. Caude, R. H. Rosset, A. G. Tambute : *Anal. Chem.*, **57**, 2819 (1985).
- 35) S. Hara, A. Dobashi, T. Hondo, M. Saito, M. Senda : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 249 (1986).
- 36) S. Hara, A. Dobashi, K. Kinoshita, T. Hondo, M. Saito, M. Senda : *J. Chromatogr.*, **371**, 153 (1986).
- 37) M. L. Lee, K. E. Markides : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 652 (1986).
- 38) R. C. Kong, S. M. Fields, W. P. Jackson, M. L. Lee : *J. Chromatogr.*, **289**, 105 (1984).
- 39) J. C. Kuei, B. J. Tarbet, W. P. Jackson, J. S. Bradshaw, K. E. Markides, M. L. Lee : *Chromatographia*, **20**, 25 (1985).
- 40) M. W. Ogden, H. M. McNair : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 816 (1985).
- 41) M. Novotny, P. David : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 647 (1986).
- 42) R. C. Kong, C. L. Woolley, S. M. Fields, M. L. Lee : *Chromatographia*, **18**, 362 (1984).
- 43) S. Rokushika, K. P. Naikwadi, A. L. Jadhav, H. Hatano : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 480 (1985).
- 44) S. Rokushika, K. P. Naikwadi, A. L. Jadhav, H. Hatano : *Chromatographia*, **22**, 209 (1986).
- 45) Y. Hirata, F. Nakata : *J. Chromatogr.*, **295**, 315 (1984).
- 46) Y. Hirata, F. Nakata, M. Kawasaki : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 633 (1986).
- 47) T. Takeuchi, D. Ishii, M. Saito, K. Hibi : *J. Chromatogr.*, **295**, 323 (1984).
- 48) E. J. Guthrie, H. E. Schwartz : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 236 (1986).
- 49) T. L. Chester, D. P. Innis, G. D. Owens : *Anal. Chem.*, **57**, 2243 (1985).
- 50) T. L. Chester, D. P. Innis : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 178 (1986).
- 51) T. L. Chester, D. P. Innis : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 209 (1986).
- 52) R. W. Bally, C. A. Cramers : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 626 (1986).
- 53) R. D. Smith, J. L. Fulton, R. C. Petersen, A. J. Koprieva, B. W. Wright : *Anal. Chem.*, **58**, 2057 (1986).



- 54) E. Lundanes, T. Greibrokk : *J. Chromatogr.*, **349**, 439 (1985).
- 55) E. Lundanes, B. Iversen, T. Greibrokk : *J. Chromatogr.*, **366**, 391 (1986).
- 56) R. D. Smith, H. R. Udseth : *Anal. Chem.*, **59**, 13 (1987).
- 57) H. T. Kalinoski, H. R. Udseth, E. K. Chess, R. D. Smith : *J. Chromatogr.*, **394**, 3 (1987).
- 58) G. Holzer, L. H. Zalkow, C. F. Asibal : *J. Chromatogr.*, **400**, 317 (1987).
- 59) K. Matsumoto, S. Tsuge, Y. Hirata : *Anal. Sci.*, **2**, 3 (1986).
- 60) J. B. Crowther, J. D. Henion : *Anal. Chem.*, **57**, 2711 (1985).
- 61) S. D. Zaugg, S. J. Deluca, G. U. Holzer, K. J. Voorhees : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, 100 (1987).
- 62) A. J. Berry, D. E. Games, J. R. Perkins : *J. Chromatogr.*, **363**, 147 (1986).
- 63) E. D. Lee, J. D. Henion, R. B. Cody, J. A. Kinsinger : *Anal. Chem.*, **59**, 1309 (1987).
- 64) D. A. Laude, Jr., S. L. Pentoney, Jr., P. R. Griffiths, C. L. Wilkins : *Anal. Chem.*, **59**, 2283 (1987).
- 65) B. W. Wright, H. T. Kalinoski, H. R. Udseth, R. D. Smith : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 145 (1986).
- 66) K. H. Shafer, P. R. Griffiths : *Anal. Chem.*, **55**, 1939 (1983).
- 67) M. E. Hughes, J. L. Fasching : *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 535 (1985).
- 68) J. W. Jordan, L. T. Taylor : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 82 (1986).
- 69) S. V. Olesik, S. B. French, M. Novotny : *Chromatographia*, **18**, 489 (1984).
- 70) C. C. Johnson, J. W. Jordan, L. T. Taylor, D. W. Vidrine : *Chromatographia*, **20**, 717 (1985).
- 71) K. H. Shafer, S. L. Pentoney, Jr., P. R. Griffiths : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **7**, 707 (1984).
- 72) K. H. Shafer, S. L. Pentoney, Jr., P. R. Griffiths : *Anal. Chem.*, **58**, 58 (1986).
- 73) C. Fujimoto, Y. Hirata, K. Jinno : *J. Chromatogr.*, **332**, 47 (1985).
- 74) S. L. Pentoney, Jr., K. H. Shafer, P. R. Griffiths, R. Fuoco : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 168 (1986).
- 75) S. L. Pentoney, Jr., K. H. Shafer, P. R. Griffiths : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 230 (1986).
- 76) K. Jinno : *Chromatographia*, **23**, 55 (1987).
- 77) J. C. Fjeldsted, B. E. Richter, W. P. Jackson, M. L. Lee : *J. Chromatogr.*, **279**, 423 (1983).
- 78) J. C. Gluckman, D. C. Shelly, M. V. Novotny : *Anal. Chem.*, **57**, 1546 (1985).
- 79) W. R. West, M. L. Lee : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 161 (1986).
- 80) K. E. Markides, E. D. Lee, R. Bolick, M. L. Lee : *Anal. Chem.*, **58**, 740 (1986).
- 81) P. Carraud, D. Thiebaut, M. Caude, R. Rosset, M. Lafosse, M. Dreux : *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 395 (1987).
- 82) R. L. Eatherton, M. A. Morrissey, W. F. Siems, H. H. Hill, Jr. : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 154 (1986).
- 83) S. Rokushika, H. Hatano, H. H. Hill, Jr. : *Anal. Chem.*, **59**, 8 (1987).
- 84) K. Grolimund, W. P. Jackson, M. Joppich, W. Nussbaum, K. Anton, H. M. Widner : Proceedings of the seventh international symposium on capillary chromatography, p. 625 (1986).
- 85) M. Novotny : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 137 (1986).
- 86) T. Greibrokk, A. L. Blilie, E. J. Johansen, E. Lundanes : *Anal. Chem.*, **56**, 2681 (1984).
- 87) N. L. Porter, B. E. Richter, D. J. Bornhop, D. W. Later, F. H. Beyerlein : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, 477 (1987).
- 88) G. L. Pariente, S. L. Pentoney, Jr., P. R. Griffiths, K. H. Shafer : *Anal. Chem.*, **59**, 808 (1987).
- 89) W. P. Jackson, K. E. Markides, M. L. Lee : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 213 (1986).
- 90) W. Gmuer, J. O. Bosset, E. Plattner : *J. Chromatogr.*, **388**, 143 (1987).
- 91) W. Gmuer, J. O. Bosset, E. Plattner : *J. Chromatogr.*, **388**, 335 (1987).
- 92) R. J. Skelton, Jr., C. C. Johnson, L. T. Taylor : *Chromatographia*, **21**, 3 (1986).
- 93) K. Sugiyama, M. Saito, T. Hondo, M. Senda : *J. Chromatogr.*, **332**, 107 (1985).
- 94) C. M. White, R. K. Houck : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 4 (1986).
- 95) R. G. Christensen : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 824 (1985).
- 96) J. M. Levy, J. P. Guzowski, W. E. Huhak : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, 337 (1987).
- 97) R. M. Campbell, M. L. Lee : *Anal. Chem.*, **58**, 2247 (1986).
- 98) M. Nishioka, D. G. Whiting, R. M. Campbell, M. L. Lee : *Anal. Chem.*, **58**, 2251 (1986).