

超臨界流体クロマトグラフィーによる  
脂質の分離に関する研究

第 二 卷

①

超臨界流体クロマトグラフィーによる  
脂質の分離に関する研究

平成6年12月

榊 啓二

## 目 次

本研究の目的と論文の構成	1
第一章 緒論	
1-1 SFCの特徴	1-1
1-2 SFCにおける保持	1-3
1-3 液体クロマトグラフィーにおける保持	1-4
1-4 脂質のGC、LCによる分離	1-6
1-5 本研究の目的と意義	1-7
REFERENCES	1-9
Table	1-12
Figure	1-15
第二章 超臨界CO <sub>2</sub> 、N <sub>2</sub> O、CHF <sub>3</sub> 、SF <sub>6</sub> による菌体油脂の抽出	
2-1 緒言	2-1
2-2 実験	2-1
2-2-1 菌体油脂の生産	
2-2-2 超臨界流体抽出	
2-2-3 分析	
2-3 結果と考察	2-3
2-3-1 超臨界流体への油脂の溶解度	
2-3-2 溶解度におよぼす温度圧力の影響	
2-3-3 抽出油の組成の変化	
2-4 結言	2-5
REFERENCES	2-7
Table	2-8
Figure	2-9
第三章 超臨界流体クロマトグラフィーにおける保持機構 — $\beta$ -カロテンを例として —	
3-1 緒言	3-1
3-2 実験	3-2
3-2-1 $\beta$ -カロテンの溶解度	
3-2-2 $\beta$ -カロテンのSFCにおける保持挙動測定	
3-2-3 極性充填剤、非極性充填剤における脂肪酸エステルの分離	
3-3 結果と考察	3-3
3-3-1 $\beta$ -カロテンの溶解度	
3-3-2 一定温度における保持の密度依存性	
3-3-3 一定密度における保持の温度依存性	
3-3-4 非極性固定相の保持機構	
3-3-5 極性固定相の保持機構	

3-3-6	極性充填剤、非極性充填剤における脂肪酸エステル分離	
3-4	結言	3-13
	REFERENCES	3-15
	Table	3-17
	Figure	3-21

#### 第四章 アミノ基結合シリカゲルを充填剤とするSFCによる脂肪酸エステル分離

4-1	緒言	4-1
4-2	実験	4-1
4-2-1	充填剤、カラムの調製	
4-2-2	超臨界流体クロマトグラフィー	
4-2-3	液体クロマトグラフィー	
4-3	結果と考察	4-2
4-3-1	調製アミノ基結合シリカ特性	
4-3-2	脂肪酸メチルエステルの分離挙動	
4-3-3	脂肪酸エステルの選択性におよぼす移動相密度の影響	
4-3-4	液体移動相による脂肪酸エステルの分離	
4-3-5	充填剤のキャラクタリゼーション	
4-4	結言	4-9
	REFERENCES	4-10
	Table	4-11
	Figure	4-13

#### 第五章 オクタデシル基結合シリカゲルを充填剤とするSFCによる脂肪酸エステル分離

5-1	緒言	5-1
5-2	実験	5-1
5-2-1	超臨界流体クロマトグラフィー	
5-2-2	液体クロマトグラフィー	
5-2-3	試料	
5-3	結果と考察	5-2
5-3-1	SFCにおける脂肪酸メチルエステルの溶出挙動	
5-3-2	SFCによる $\gamma$ -リノレン酸の分離、分取	
5-3-3	液体クロマトグラフィーにおける脂肪酸メチルエステルの溶出挙動	
5-3-4	エステルの保持および選択性と移動相密度の関係	
5-3-5	移動相物性の保持選択性に及ぼす効果	
3-4	結言	5-13
	REFERENCES	5-15
	Table	5-17
	Figure	5-24

第六章 オクタデシル基結合シリカゲルを固定相とするSFCによるトリグリセリドの分離

6-1	緒言	6-1
6-2	実験	6-2
6-2-1	糸状菌脂質の分離	
6-2-2	市販C18結合シリカゲルにおけるトリグリセリドの分離挙動	
6-2-3	オクタデシル基結合充填剤の調製と分離特性の測定	
6-3	結果と考察	6-4
6-3-1	SFCによる糸状菌中性脂質の分離	
6-3-2	市販C18結合シリカゲルにおけるトリグリセリドの分離挙動	
6-3-3	調製C18結合ゲルの炭素含量と不活性化度	
6-3-4	調製C18結合ゲルにおけるトリグリセリドの分離挙動	
6-3-5	トリグリセリド混合物の分離挙動	
6-3-6	温度圧力のトリグリセリド分離挙動への影響	
6-4	結言	6-14
	REFERENCES	6-16
	Table	6-18
	Figure	6-26

第七章 本研究の総括と展望

7-1	本研究の総括	7-1
7-2	今後の展望	7-6

付記

謝辞

## 本研究の目的と論文の構成

本研究の目的は、超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）を用いて脂質の分離を行い、その分離挙動と分離メカニズムを明かにし、さらにSFCに適する充填剤を開発することである。

SFCは移動相に超臨界流体を用いる分離分析手法であり、液体クロマトグラフィー（LC）とガスクロマトグラフィー（GC）の中間に位置づけられている。超臨界流体は溶解力を持つので、GCで分離不可能な高沸点物質や熱不安定物質の分離にSFCは適している。この点においてLCに類似しているが、SFCの移動相の溶解力は温度あるいは圧力によって連続的にかつ広範囲に変化するという点でLCとは異なる。また、超臨界流体の粘度は液体よりも小さく、流体中の溶質の拡散係数は液体中の拡散係数よりも大きい。このことは、カラム内の圧力損失がSFCでは小さく、分離効率を落とさずに高流速の分離が可能であることを意味する。SFCの装置が市販されてまだ10年ほどであり、GC、LCの研究の歴史に比べると、基礎・応用の両面において多くの研究、改良すべき点が残されている。

充填カラムのSFCは、多環芳香族やポリスチレン等の有機化合物の分離に用いられてきたが、脂質などの天然物への適用はまだほとんど行われていないのが現状である。この理由として、まだSFC装置が広く普及するに至っていないこと、従って応用例が少なく、どのような物質に適用できるか、どのような充填剤が使えるのか良く分かっていないことが挙げられる。

本研究では、分離対象として脂質、主に脂肪酸エステルとトリグリセリドを取り上げる。これらの脂質は構造が単純であり、また既にGC、LCを用いて分離が行われており、多くの応用例がある。それらの知見を利用し、また分離挙動を比較することでSFCの位置付けを行い、SFCの分離の特徴、利点を明らかにすることができると考えられる。その目的のため、脂質のクロマト分離における移動相、固定相の役割について検討し、SFCの分離メカニズムについて考察する。また、SFCによる脂質分離に適する充填剤の開発を目指し、脂質分離において重要となる充填剤特性を明らかにする。

本論文は七章で構成される。

第一章において、充填カラムSFCに関する既往の研究をまとめた。また、分離メカニズムの比較のため、逆相LC、順相LCにおいて提案されている保持のモデル、理論を記した。

第二章では、菌体油脂の超臨界流体による抽出を行い、脂質の溶解度と流体の種類、温度圧力の関係を調べた。

第三章では、 $\beta$ -カロテンの超臨界流体への溶解度を測定し、その溶解度とSFCにおける保持の関係を調べた。極性、非極性充填剤における分離のメカニズムについて、SFCにおける保持式、LCで提案されているモデルを用いて考察した。

第四、五章では、SFCにおける脂肪酸メチルエステルの分離挙動について記述する。

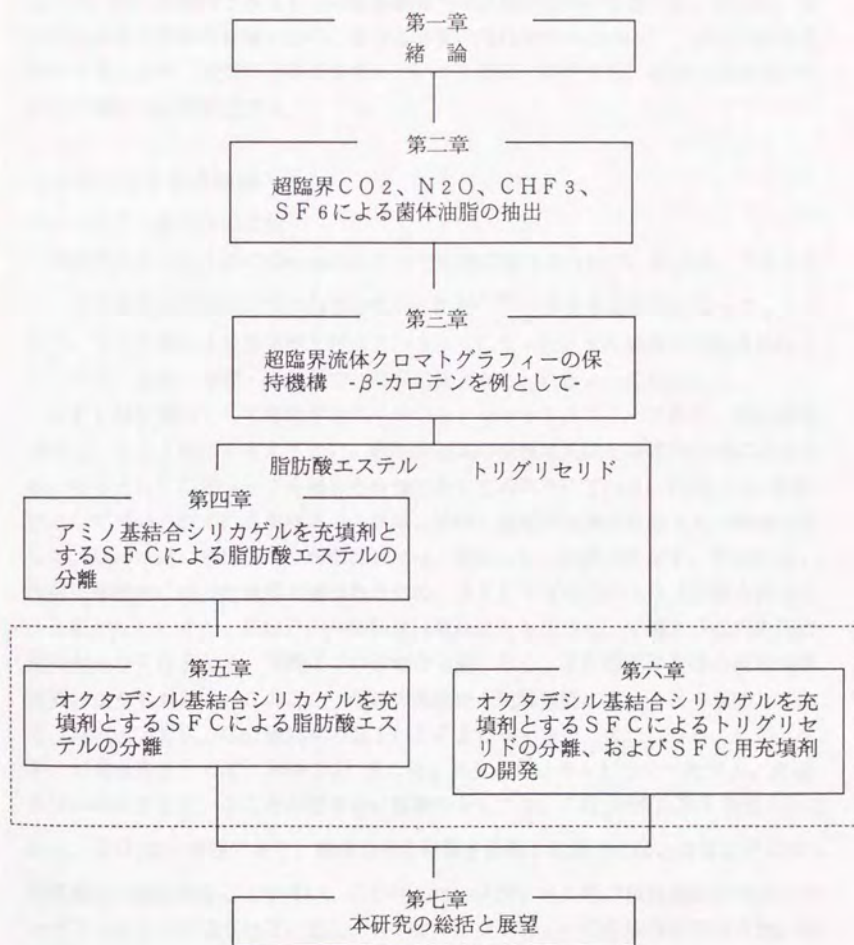
第四章では、極性充填剤を用いる脂肪酸エステルのクロマト分離について報告する。結合基密度の異なるアミノ基結合シリカゲルを調製し、脂肪酸エステルの分離挙動と充填剤特性の関係を調べた。またLCにおける分離挙動を調べ、SFCとLCを比較した。

第五章では、非極性のオクタデシル基結合シリカゲルを充填剤として、SFCにより脂肪酸エステルを分離する。脂肪酸エステルの溶出挙動と選択性について、移動相が超臨界流体と液体の場合の違いを論じる。

第六章では、オクタデシル基結合シリカゲルを充填剤とするSFCによりトリグリセリドの分離を行う。まず、市販のオクタデシル基結合シリカゲルのSFC充填剤としての適性を調べた。さらに、特性の異なるオクタデシル基結合シリカゲルを調製し、トリグリセリドの溶出挙動と充填剤特性の関係を調べた。SFCとLCにおけるトリグリセリド分離挙動の違いの由来について考察する。

第七章では、本研究全体の総括および今後の展望を記述した。

## 論文の構成





## 第一章 緒論

本章では、まず超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）の特徴について、液体クロマトグラフィー（LC）、ガスクロマトグラフィー（GC）と比較しながら概説する。特に充填カラムSFCの生体物質への応用例について述べる。さらに、SFCにおける保持の理論、LCにおける溶質保持のモデルについて、既往の研究を紹介する。また、脂質の分離の実例についても簡単に紹介する。最後に本研究の目的と意義について記述する。

### 1-1 SFCの特徴<sup>1-32)</sup>

#### 1) LC、GCとの比較

SFCは1962年にKlesperらによって最初に報告された<sup>33)</sup>。その後、SFCについての研究は活発には行われていなかったが<sup>34-43)</sup>、1980年代になって、そのLC、GCと異なる分離挙動が注目されるようになった。また装置が市販されたこともあり、装置・基礎・応用面で活発に研究が行われるようになった。

SFCは移動相として超臨界流体を用いるクロマトグラフィーであり、その原理はGC、LCと同じと考えてよい。超臨界流体の物性は気体と液体の中間にあるため、GCとLCのギャップを埋める分離法として期待されている。Table 1-1に移動相として用いられている条件下での気体、液体、超臨界流体のおおよその物性を示した。液体に近い密度を持つ超臨界流体は、物質に対し溶解力を示す。そのため、溶質は移動相に溶けた状態で運ばれるため、SFCではGCのように溶質を気化する必要がない。また、超臨界流体の粘度は液体よりも小さく、充填カラム内の圧力損失が小さくなるため、高流速での分離が可能になる。また超臨界流体の拡散係数は液体よりも大きい。このことは超臨界流体中の物質移動が速いことを意味しており、高流速下で生じる分離効率の低下がLCよりも小さい。また、GC、LC、SFCの特徴をまとめて、Table 1-2に示した。SFCではキャピラリーカラム、充填カラムの両方を用いることができる。移動相としては、CO<sub>2</sub>が最も広く利用されている。CO<sub>2</sub>は非極性であり、極性のある物質を分離する場合には、溶質の固定相への吸着が問題となることが多い。この時には、メタノール等の極性溶媒がモディファイアーとして添加される。また、各クロマトグラフィーの分離様式であるが、GCでは溶質の沸点の差、あるいは固定相との相互作用の差で分離が行われる。一方、LCでは固定相との相互作用、移動相との相互作用がともに重要になるが、特に移動相液体の選択が重要とされる。SFCでは用いられる移動相の種類は多くないが、

温度圧力の変化で移動相の物性が連続的にかつ大きく変化するという特徴がある。SFCの固定相には、GC、LCで用いられている固定相がともに利用できる。キャピラリーカラムでは、SFC専用のものが市販されているが、SFC専用の充填剤は現在のところまだ市販されていない。

## 2) SFCの操作条件

SFCでは、移動相には主にCO<sub>2</sub>が用いられている。CO<sub>2</sub>の状態図をFig. 1-1に示す。図で斜線で示したところの条件で行われることが多く、一般に温度35~200℃、圧力50~500 atmの範囲である。ただし、固定相の種類、検出器の種類によって操作条件は変化する。臨界点に近い温度圧力範囲では、圧力によって密度が大きく変化することが分かる。SFCにおける保持は移動相の密度と密接な関係があるため(1-2節参照)、圧力によって分離挙動は大きく変化する。一般に充填カラムSFCでは、高い密度で操作されることが多く、キャピラリーカラムSFCでは高温低密度で用いられることが多い。またSFCは移動相の密度が高く溶解力が大きくなる条件ではLCに、低密度で溶解力が小さい条件ではGCに近くなる。充填カラム、キャピラリーカラムを固定相とした場合の各々の代表的な操作条件をTable 1-3に示す。また、理論段高と流速の関係をFig. 1-2に示す。充填カラムでは、溶質の移動相中での拡散係数が1桁ほどSFCでは大きいので、高流速下でも分離段数の低下がLCよりも小さくなる。一方、キャピラリーカラムでは、GCよりも最適線速度は小さくなる。これは、超臨界流体中の物質の拡散係数が気体中よりも小さいためである。キャピラリーカラムでの実際の分離では、分離に時間がかかるため最適線速度よりも大きい流速で操作されることが多い。一般に、簡単な成分を短時間で分離するにはパッドカラムが、複雑な成分を長時間をかけて分離するにはキャピラリーカラムが適していると言われている。

パッドタイプのSFC装置の一例をFig. 1-3に示す。図の装置は超臨界抽出にも利用できるようになっているが、クロマトグラフィー部の構成はLCとほぼ同じである。抽出カートリッジから背圧調製バルブまでのラインはオープンに入れられている。CO<sub>2</sub>は液体状態でポンプで系内に送られ、オープン内で温められ超臨界状態になる。系の圧力は出口の背圧調製弁で、流速はポンプによって調節される。インジェクターから導入された試料はカラムで分離され、UV検出器によって検出される。UV検出器には耐圧セルが用いられる。その他の検出器としてはFIDが一般的に用いられている。

## 3) 充填カラムSFCの生体物質分離への応用

充填カラム SFC は、芳香族炭化水素、ポリスチレンオリゴマー、ポリマー添加物の他、生体物質の分離にも用いられている。生体物質では、食品関連物質への適用例が多い。Table 1-4 に今までに報告された生体物質への主な適用例を示した<sup>44-58)</sup>。天然物の分析を目的とする場合は、キャピラリーカラムの適用が多い。しかし、SFC の生体物質分離への適用はまだまだ少ないのが現状である。

#### 4) キャピラリーカラム SFC の脂質分析への応用

天然脂質の分析がキャピラリーカラム SFC を用いて行われている<sup>59-65)</sup>。その例を Table 1-5 に示した。通常は高温で操作されるため、キャピラリー GC による分離 (1-4 参照) のように炭素数の違いによって分離される場合が多い。ユニークな例としては、キャピラリーの中に硝酸銀を担持させたイオン交換樹脂を充填し、銀イオンの二重結合に対する親和力を利用して不飽和度の違いによって分ける方法がある。

### 1-2 SFC における保持

Martire は格子流体モデルを用い、吸収 (分配) クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーの保持を与える一般式を導出し、この一般式を SFC の保持にも適用した<sup>66-69)</sup>。分配クロマトグラフィータイプの SFC における保持を与える式を次に示す。

$$\ln K = \ln K_0 + F(T_R, \rho_R) \quad (1-1)$$

$$\ln K_0 = \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \left(\frac{r_b}{r_d} - r_b\right) + \frac{(1 + \sqrt{r_b})^2}{T_R} \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \left(\frac{\epsilon_{ad}}{\epsilon_{bb}} - \frac{\epsilon_{dd}}{2\epsilon_{bb}}\right) \quad (1-2)$$

$$F(T_R, \rho_R) = \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \left[ (\sqrt{r_b} - 1) \rho_R - (\sqrt{r_b} + 1) \left(\frac{\epsilon_{ab}}{\epsilon_{bb}}\right) \left(\frac{\rho_R}{T_R}\right) + \left(\frac{\rho_R^2}{2T_R}\right) \right] \quad (1-3)$$

ここで  $K$  は分配係数、 $r_i$  は  $i$  の分子のセグメント数、 $\epsilon_{ij}$  は  $i$ 、 $j$  分子のセグメント間の相互作用のエネルギー、 $\rho_R$  は換算密度、 $T_R$  は換算温度、 $R$  は気体定数である。添字の  $a$ 、 $b$ 、 $d$  はそれぞれ溶質、溶媒、固定相リガンドを表す。また上式では、移動相の固定相への吸収、吸着による影響はないと仮定している。保持は密度の二次関数となり、低密度の範囲では、保持は密度の増加とともに減少する。一方、高密度では、保持は密度の増大とともに増加する。

また Schoenmakers も同様に、SFC における保持比の対数は密度の二次関数になることを報告している<sup>26)</sup>。また、限られた密度範囲では、保持比の対数が密度の対

数に対して直線になることも知られている<sup>26)</sup>。

吸着液体クロマトグラフィーでは、吸着係数は次のように表される。

$$\ln K = \ln K_b - \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \ln \theta_{b(m)} - \left(\frac{r_a z_c}{k_B T}\right) (1 - f_s)(1 - \theta_{b(m)})(\varepsilon_{ab} - \varepsilon_{ac} + \varepsilon_{bc} - \varepsilon_{bb}) \quad (1-4)$$

$$\ln K_b = \left(1 - \frac{r_a}{r_b}\right) \ln \left(\frac{z_m - 1}{z_s - 1}\right) + \left(\frac{r_a z_c f_s}{k_B T}\right) (\varepsilon'_{bs} - \varepsilon'_{as} + \varepsilon_{ab} - \varepsilon_{bb}) \quad (1-5)$$

式1-4、1-5は、移動相が強溶媒bと弱溶媒cの二成分から成り、bの成分が固定相表面を被っていると仮定した場合の液体クロマトグラフィーの保持である。 $\theta_{b(m)}$ は移動相中でbのhard coreによって占められる体積割合、 $z_m$ は移動相の近接格子数(立方体格子で $z_m=6$ )、 $z_s$ は固定相の近接格子数(正方形格子で $z_s=6$ )、 $z_c$ は分子セグメントの近接外部接触数( $4 \leq z_c \leq 6$ )、 $f_s$ は吸着剤表面と接触している分子表面積の割合、 $\varepsilon'_{bs}$ はiの分子セグメントと吸着剤サイトとの相互作用自由エネルギー、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は温度である。高密度の超臨界流体の場合の保持は、上式で $\varepsilon_{ac}$ 、 $\varepsilon_{bc}$ を消去して、 $\theta_{b(m)}$ に次式を導入できる。

$$\theta_{b(m)} = \frac{\rho R}{(1 + \sqrt{r_b})} \quad (1-6)$$

### 1-3 液体クロマトグラフィーにおける保持機構

#### 1) 逆相液体クロマトグラフィーの保持機構

##### 吸着モデル

Horvath et al. はsolvophobic (疎溶媒性)理論に基づいて、逆相LCの保持を説明した<sup>70,71)</sup>。彼らは、溶質と非極性固定相の間の相互作用よりも、溶質と極性移動相との間の反発が、溶質の固定相への保持の主なdriving forceと考えた。保持のプロセスをFig. 1-4に示した。溶質の移動の自由エネルギー変化は、溶質と固定相とのvan der Waals力( $\Delta G^{\circ}_{vdw}$ )、溶質サイズのcavityを移動相液体中に形成する自由エネルギー( $\Delta G^{\circ}_c$ )、溶質と溶媒との相互作用の自由エネルギー ( $\Delta G^{\circ}_{int}$ 、van der Waals相互作用の自由エネルギー、静電的相互作用項を含む)、および自由体積の減少によるエントロピー項によって次式のように表される。

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ}_{vdw} - \Delta G^{\circ}_c - \Delta G^{\circ}_{int} - RT \ln \left( \frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (1-7)$$

彼らは、 $\Delta G^{\circ}_{vdw}$ を小さいと考えて無視し、 $\Delta G^{\circ}_c$ を溶質の表面積と表面張力で表し次

式を導いた。

$$\ln k' = \ln \phi + \frac{1}{RT} \left[ \Delta A (N\gamma + a) + N A_b \gamma (\kappa^e - 1) + W - \frac{\Delta Z}{\epsilon} \right] + \ln \frac{RT}{P_0 V} \quad (1-8)$$

ここで  $k'$  は保持比、 $\phi$  はカラムにおける相比、 $\Delta A$  は会合による面積の減少分、 $N$  はアボガドロ数、 $\gamma$  は表面張力、 $a$ 、 $W$  は溶媒特性パラメーター、 $A_b$  は溶媒の表面積、 $\kappa^e$  はマクロの表面積を分子次元にするためのパラメーター、 $\epsilon$  は誘電率、 $\Delta Z$  は静電相互作用の自由エネルギーを  $\Delta G_{es}^0 = Z\epsilon$  と表した時の、 $Z$  の変化である。

### 分配モデル

Dorsey et al. は R P L C の溶質の保持は分配モデルに従うと考えた<sup>72-76</sup>。分配モデルにおける溶質の固定相への移動のプロセスは、(1) 固定相に溶質サイズの cavity をつくる、(2) 移動、(3) 移動相の溶質サイズの cavity を閉じるプロセスからなる (Fig. 1-5)。彼らは格子流体モデルを用いたが、そこでは分子 S は  $z$  個の近接分子に囲まれている。溶質の移動プロセスにより、 $z$  個の S C 結合の形成と、 $z$  個の S A 結合の消滅が生じる。cavity 形成の自由エネルギーは  $(-z/2)w_{cc}$  となる。移動の自由エネルギー変化は

$$\frac{\Delta \mu^0}{RT} = \frac{z}{RT} (w_{SC} - w_{SA} + \frac{w_{AA}}{2} - \frac{w_{CC}}{2}) = \chi_{SC} - \chi_{SA} \quad (1-9)$$

$$\chi_{XY} = \frac{z}{RT} (w_{XY} - \frac{w_{XX} + w_{YY}}{2}) \quad (1-10)$$

$\chi$  は相互作用パラメーターで、S、A、C はそれぞれ溶質、溶媒、固定相リガンドを表す。彼らは、固定相中に cavity をつくるエネルギーが保持に関与するとしており、Fig. 1-6 に示すように、 $C_{18}$  結合密度の高いところではリガンドの立体的な動きの制限が生じ (秩序化)、溶質を固定相から排除しようとする力が強くなるため保持が低下する。分子間力が分散力による場合、相互作用パラメーターは溶解パラメーター  $\delta$  で表される。

$$\chi_{XY} = \text{constant} \times (\delta_X - \delta_Y)^2 \quad (1-11)$$

また、クロマトグラフィーの保持は次式で表される<sup>77,78</sup>。

$$\ln k' = \frac{v'}{RT} [(\delta_S - \delta_A)^2 - (\delta_S - \delta_C)^2] + \ln \frac{n_C}{n_A} \quad (1-12)$$

$v'$  は溶質のモル体積、 $n_C$ 、 $n_A$  はカラムにおける移動相、固定相のモル数である。しかし、分子間力が分散力だけでなく水素結合、双極子相互作用などが含まれる場合

は、上式は定量的でなくなる<sup>72,79)</sup>。これは、溶解パラメーター導出のモデルがランダム混合を仮定しておりエントロピー効果を考えていないこと、二種分子間の分子間力が各分子の分子間力の幾何平均で表されるという近似を用いていることに由来する。

## 2) 順相液体クロマトグラフィーの保持機構

Snyderは、吸着クロマトグラフィーの保持機構として、吸着活性点に保持されている  $m$  個の溶媒分子が一個の溶質と入れ替わるというモデルを考えた<sup>80)</sup>。その時の保持比は次式で与えられた。

$$\ln k' = \ln \phi - \frac{(\Delta G_{as}^{\circ} - m\Delta G_{bs}^{\circ})}{RT} \quad (1-13)$$

$$= \ln \phi + \ln V_a + a'(E^{\circ} - A_s \epsilon^{\circ}) \quad (1-14)$$

$\Delta G_{as}^{\circ}$ 、 $\Delta G_{bs}^{\circ}$  はそれぞれ溶質と吸着剤、溶媒と吸着剤の相互作用の自由エネルギーである。 $V_a$  は吸着剤 1 g 当たりの表面容積、 $a'$  は吸着剤の活性度、 $E^{\circ}$  は溶質の吸着エネルギー、 $A_s$  は溶質が吸着剤表面で占める面積、 $\epsilon^{\circ}$  は溶媒強度パラメーターである。上式では、移動相中での相互作用（溶質-溶媒間、溶媒-溶媒間）が無視されている。

## 1-4 脂質のGC、LCによる分離<sup>81-93)</sup>

低分子量の脂質の分析にはGCが広く用いられている。特に、分析目的の場合にはキャピラリーGCが優れた分離能を示す。ただし、キャピラリーGCは負荷試料量が微量なので、分取を目的とする場合には他の方法が用いられる。またGCは分子量が大きく極性の高い物質の分離には適していない。その時は、各種LCが用いられる。中性脂質をその炭素数や不飽和度によって分離するには、逆相クロマトグラフィーが用いられる。トリグリセリドはグリセリンに脂肪酸が三つエステル結合した中性脂質であるが、その分離例をFig. 1-7、1-8に示す。それぞれ、バタートリグリセリドをキャピラリーGCと、 $C_{18}$ 結合ゲルを充填剤とするLCで分離したものである。キャピラリーGCでは、トリグリセリドは通常分子量の違いによって分離される。炭素数が同じで不飽和度の異なるトリグリセリドは類似した沸点を示し、GCでの完全分離は難しい。また $C_{18}$ 充填剤のLCでは、炭素数の小さい順に、また不飽和度の大きいものから溶出する。またこの溶出順に法則性のあることも知られている。Fig. 1-7、1-8のように分子量分布の広い試料の場合には、GCでは昇温ブ

ログラミング法、LCではグラジエント溶出法が用いられる。なお、本研究では、主に脂肪酸エステルとトリグリセリドの分離を扱う。

### 1-5 本研究の目的と意義

近年、超臨界流体抽出法が新しい分離手法として注目されるようになり、食品、医薬品、香料の分野において活発な研究が行われている。超臨界流体抽出法の長所として、液体溶媒と比べて高い選択性と大きい物質移動速度、さらに減圧することにより溶けていた試料を容易に析出回収できるという点が挙げられる。しかし、超臨界流体抽出法は極性や分子量の大きく異なる物質の分離には有効であるが、類似した構造の物質間の分画は困難であり、他の分離法と組み合わせる必要がある。特に、バイオ生産物からの生体関連物質の単離には、構造の類似した物質間の精密分離が必要である。

クロマトグラフィー法は、その高い分離能が特徴であり、充填カラムLCで1万段以上、キャピラリーカラムGCで10万段以上の理論段数を得ることができる。このため、超臨界流体抽出法の利点を生かしたクロマトグラフィー、SFCが生体関連物質の高度分離に適用できると考えられる。さらに、SFCには、分離した物質の回収が容易でかつ高速分離が可能という特徴があるので、物質の分取法としても期待できる。

本研究では、SFCによる脂質の分離を行う。極性の低い脂質は超臨界CO<sub>2</sub>によく溶解するため、SFCの対象として適している。また、近年脂質の生体内での機能が注目されるようになり、天然脂質に含まれているEPA（エイコサペンタエン酸）、DHA（ドコサヘキサエン酸）等の多価不飽和脂肪酸を医薬品や機能性食品として単離濃縮する方法について研究が進められている。これらの脂質の単離には多くの類似した構造の夾雑物を除く必要があり、また熱や酸素に対して不安定である。SFCはそれらの新しい分離法として期待できる。さらに、脂質の分離法としてGC、LCがよく用いられているが、分子種の多いトリグリセリドのような脂質群の定量分析は両者を合わせても不十分であった。例えば、n種の脂肪酸で構成されるトリグリセリドの分子種は、光学異性体も含めて $n^3$ 、位置異性体を考慮に入れない場合でも $(n^3 + 3n^2 + 2n) / 6$ になる。SFCは、GC、LCと異なる分離挙動を示すため、GC、LCを補う脂質分析法として期待できる。SFCの脂質分離・分析への適用はまだほとんど行われておらず、まずその分離挙動をLC、GCと比較し、基礎的な知見を得ることが重要である。そこで本研究の目的として、  
(1) 超臨界流体の種類、温度圧力が脂質の溶解度に及ぼす影響を検討する。超臨界抽出法については既に多くの報告があるので、それらを参考にしつつ、脂質と超

臨界流体との相互作用について考察する。

(2) SFCの分離のメカニズムをLCと比較し、その差異の生じる原因を探り、またSFCの特徴づけを行う。SFCの分離メカニズムの解明は、対象物質の分離挙動を予測する上でも、また充填剤の選定や開発においても重要である。

(3) (1) (2)の結果を踏まえて脂質のSFC分離を行い、その溶出挙動を調べる。温度圧力が分離に及ぼす効果、固定相の違いによる分離挙動の違いを調べる。実際の油脂の分離分析や目的成分の単離にSFCが適用できるかどうか、検討する。溶質の分子構造と分離挙動の関係についても検討する。

(4) 従来SFCでは、GCやLCで用いられている充填剤、カラムがそのまま利用されてきたが、SFCの特徴をいかすには専用の充填剤が必要と思われる。そこで、(1)～(3)の結果をもとに、脂質分離に適した充填剤の開発を行う。

上述の(1)～(4)のテーマを明らかにすることが本研究の目的である。



REFERENCES

- 1) 竹内豊英、石井大道 "化学の領域増刊138号 高分解能クロマトグラフィー" 南江堂、p.59 (1983).
- 2) 藤田一紀、油化学、**32**, 551 (1983).
- 3) 藤田一紀、ふんせき、**1985**, 847 (1985).
- 4) 斎藤宗雄、本堂敏信、油化学、**35**, 273 (1986).
- 5) 前田恒昭、保母敏之、ふんせき、**1988**, 332 (1988).
- 6) 六鹿宗治、表面、**26**, 92 (1988).
- 7) 平田幸夫 "化学総説No.9 クロマトグラフィーの新展開" 学会出版センター、P130 (1990).
- 8) 杉山謙吉、ふんせき、**1991**, 205 (1991).
- 9) Klesper, E., "Extraction with Supercritical Gases", Schneider, G. M., Stahl, E., Wilke, G., eds.; Verlag Chemie, Weinheim Deerfield Beach, Florida Basel, p115 (1980).
- 10) Peadar, P. A., Lee, M. M., *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 179 (1982).
- 11) Lauer, H. H., MaManigill, D. M., Board, R. D., *Anal. Chem.*, **55**, 1370 (1983).
- 12) Chester, T. L., *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 226 (1986).
- 13) Schmitz, F. P., Klesper, E., *J. Chromatogr.*, **388**, 3 (1987).
- 14) Chester, T. L., Pinkston, J. D., Raynie, D. E., *Anal. Chem.*, **64**, 153R (1992).
- 15) Petersen, M., *J. Chromatogr.*, **505**, 3 (1990).
- 16) Janssen, H.-G., Cramers, C. A., *J. Chromatogr.*, **505**, 19 (1990).
- 17) Berger, T. A., *J. Chromatogr.*, **478**, 311 (1989).
- 18) Kong, R. K., Fields, S. M., Jackson, W. P., Lee, M. L., *J. Chromatogr.*, **289**, 105 (1984).
- 19) Graham, J. A., Rogers, L. B., *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 75 (1980).
- 20) Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L. T., *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 331 (1988).
- 21) van Wasen, U., Swaid, I., Schneider, G. M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 575 (1980).
- 22) Blilie, A. L., Greibrokk, T., *Anal. Chem.*, **57**, 2239 (1985).
- 23) Leyendecker, D., Leyendecker, D., Schmitz, F. P., Klesper, E., *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1917 (1987).
- 24) Gere, D. R., Board, R., McManigill, D., *Anal. Chem.*, **54**, 736 (1982).
- 25) Engelhardt, H., Gross, A., Mertens, R., Petersen, M., *J. Chromatogr.*, **477**, 169 (1989).
- 26) Schoenmakers, P. J., *J. Chromatogr.*, **315**, 1 (1984).
- 27) Hutz, A., Schmitz, F. P., Leyendecker, D., Klesper, E., *J. Supercrit. Fluids*, **3**, 1 (1990).
- 28) Hirata, Y., Nakata, F., *J. Chromatogr.*, **295**, 315 (1984).
- 29) Hirata, Y., *J. Chromatogr.*, **315**, 31 (1984).
- 30) Berger, T. A., Deye, J. F., *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 390 (1991).
- 31) Smith, R. M., Sanagi, M. M., *J. Chromatogr.*, **505**, 147 (1990).
- 32) Luffer, D. R., Ecknig, W., Novotny, M., *J. Chromatogr.*, **505**, 79 (1990).
- 33) Klesper, E., Corwin, A. H., Turner, D. A., *J. Org. Chem.*, **27**, 700 (1962).
- 34) Fuzita, K., Shimokobe, I., Nakazima, F., *Nihon Kagaku Kaishi*, **1975**, 1348 (1975).
- 35) Giddings, J. C., *Sep. Sci.*, **1**, 73 (1966).

- 36) Giddings, J. C., Myers, M. N., McLaren, L., Keller, R. A., *Science*, **162**, 67 (1968).
- 37) Giddings, J. C., Myers, M. N., King, J. W., *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 276 (1969).
- 38) Klesper, E., Hartmann, W., *Polym. Lett. Ed.*, **15**, 9 (1977).
- 39) Novotny, M., Bertsch, W., Zlatkis, A., *J. Chromatogr.*, **61**, 17 (1971).
- 40) Semonian, B. P., Rogers, L. B., *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 49 (1978).
- 41) Sie, S. T., van Beersum, W., Rijnders, G. W. A., *Sep. Sci.*, **1**, 459 (1966).
- 42) Conaway, J. E., Graham, J. A., Rogers, L. B., *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 102 (1978).
- 43) Graham, J. A., Rogers, L. B., *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 175 (1980).
- 44) Aubert, M.-C., Lee, C. R., Krstulovic, A. M., Lesellier, E., Pechard, M.-R., Tchaplá, A., *J. Chromatogr.*, **557**, 47 (1991).
- 45) Lesellier, E., Tchaplá, A., Pechard, M.-R., Lee, C. R., Krstulovic, A. M., *J. Chromatogr.*, **557**, 59-67 (1991).
- 46) Shah, S., Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L. T., *Chromatographia*, **27**, 441 (1989).
- 47) Sugiyama, K., Shiokawa, T., Moriya, T., *J. Chromatogr.*, **515**, 555 (1991).
- 48) Cocks, S., Smith, R. M., *Anal. Proc. (London)*, **28**, 11 (1991).
- 49) Sakaki, K., *J. Chromatogr.*, **648**, 451 (1993).
- 50) Kubota, M., Matsuzaki, H., Takahashi, S., Inoue, S., *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **15**, 446 (1989).
- 51) France, J. E., Snyder, J. M., King, J. W., *J. Chromatogr.*, **540**, 241 (1991).
- 52) Saito, M., Yamauchi, Y., *J. Chromatogr.*, **505**, 257 (1990).
- 53) Yamauchi, Y., Saito, M., *J. Chromatogr.*, **505**, 237 (1990).
- 54) Taylor, L. T., Chang, H.-C. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 357 (1990).
- 55) Janicot, J. L., Caude, M., Rosset, R., *J. Chromatogr.*, **437**, 351 (1988).
- 56) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., Sakaki, K., Yokochi, T., *Anal. Chem.*, **61**, 2076 (1989).
- 57) Sakaki, K., Sako, T., Yokochi, T., Suzuki, O., Hakuta, T., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **37**, 54 (1988).
- 58) Nomura, A., Yamada, J., Takatsu, A., Horimoto, Y., Yarita, T., *Anal. Chem.*, **65**, 1994 (1993).
- 59) Staby, A., Borch-Jensen, C., Balchen, S., Møllerup, J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 355 (1994).
- 60) Huopalahti, R., Laakso, P., Saaristo, J., Linko, R., Kallio, H., *HRC&CC*, **11**, 899 (1988).
- 61) Shen, Y., Huang, H., Liu, X., Wang, Q., Zhou, L., *HRC&CC*, **17**, 74 (1994).
- 62) Demirbürker, M., Hägglund, I., Blomberg, L. G., *J. Chromatogr.*, **605**, 263 (1992).
- 63) Demirbürker, M., Blomberg, L. G., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 67 (1990).
- 64) Demirbürker, M., Blomberg, L. G., *J. Chromatogr.*, **550**, 763 (1991).
- 65) Demirbürker, M., Blomberg, L. G., *J. Chromatogr.*, **600**, 358 (1992).
- 66) Martire, D. E., Boehm, R. E., *J. Phys. Chem.*, **91**, 2433 (1987).
- 67) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1569 (1987).
- 68) Martire, D. E., *J. Chromatogr.*, **452**, 17 (1988).
- 69) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1779 (1988).
- 70) Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).

- 71) Horvath, C., Melander, W., *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 393 (1977).
- 72) Dorsey, J. G., Dill, K. A., *Chem. Rev.*, **89**, 331 (1989).
- 73) Dill, K. A., *J. Phys. Chem.*, **91**, 1980 (1987).
- 74) Sentell, K. B., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.*, **61**, 930 (1989).
- 75) Ying, P. T., Dorsey, J. G., Dill, K. D., *Anal. Chem.*, **61**, 2540 (1989).
- 76) Sentell, K. B., Dorsey, J. G., *J. Chromatogr.*, **461**, 193 (1989).
- 77) Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., de Galan, L., *J. Chromatogr.*, **218**, 261 (1981).
- 78) Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., de Galan, L., *J. Chromatogr.*, **282**, 107 (1983).
- 79) Karger, B. L., Snyder, L. R., Eon, C., *Anal. Chem.*, **50**, 2126 (1978).
- 80) Snyder, L. R., "Principles of Adsorption Chromatography", Marcel Dekker, New York, chapter 8 (1968).
- 81) Wojtusik, M. J., Brown, P. R., Turcotte, J. G., *Chem. Rev.*, **89**, 397 (1989).
- 82) Maniongui, C., Gresti, J., Bugaut, M., Gauthier, S., Bezar, J., *J. Chromatogr.*, **543**, 81 (1991).
- 83) Phillips, F. C., Erdahl, W. L., Schmit, J. A., Privett, O. S., *Lipids*, **19**, 880 (1984).
- 84) Christie, W. W., *J. Chromatogr.*, **454**, 273 (1988).
- 85) Rezanka, T., Mares, P., *J. Chromatogr.*, **542**, 145 (1991).
- 86) Palmer, A. J., Palmer F. J., *J. Chromatogr.*, **465**, 369 (1989).
- 87) Podlaha, O., Torgard, B., *J. Chromatogr.*, **482**, 215 (1989).
- 88) Plattner, R. D., Spencer, G. F., Kleiman, R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 511 (1977).
- 89) Wada, S., Koizumi, C., Nonaka, J., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **26**, 95 (1977).
- 90) Wada, S., Koizumi, C., Takiguchi, A., Nonaka, J., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **27**, 579 (1978).
- 91) Itabashi, Y., Takagi, T., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **29**, 855 (1980).
- 92) Hibino, H., Fukuda, N., Kudo, K., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **34**, 111 (1985).
- 93) Geeraert, E., Sandra, P., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 100 (1987).

Table 1-1 Physical properties of gases, liquids and supercritical fluids as chromatographic mobile phases.

移動相	密度 (g/cm <sup>3</sup> )	粘度 (10 <sup>-4</sup> g/cm s)	拡散係数 (cm <sup>2</sup> /s)
気体	(0.6 - 2.0) × 10 <sup>-3</sup>	0.5 - 3.5	0.01 - 1.0
超臨界流体	0.2 - 0.9	2.0 - 9.9	(0.5 - 2.0) × 10 <sup>-4</sup>
液体	0.8 - 1.0	30 - 240	(0.5 - 3.3) × 10 <sup>-5</sup>

Table 1-2 Features of typical GC, LC and SFC.

	固定相	移動相	分離の特徴
GC	ケイソウ土、それに 各種液相を担持 キャピラリーカラム	He, N <sub>2</sub>	固定相との相互作用で分離。どの様な固定相を 選択するかが重要。
LC	シリカゲル、ODS ポリマー樹脂	各種有機溶媒を混合 して使用	固定相との相互作用、移動相との相互作用で分 離。特に液相の選択が重要になる。
SFC	シリカゲル、ODS、 キャピラリーカラム	CO <sub>2</sub> (+モデファ イアー)	固定相との相互作用、移動相との相互作用で分 離。両相の選択性への寄与は次のようになる。 固定相の寄与 LC < SFC < GC 移動相の寄与 GC < SFC < LC

Table 1-3 Features of typical packed-column SFC and capillary-column SFC.

	パッキングカラム	キャピラリーカラム
カラム径	2 - 10 mm	50 $\mu$ m
カラム長さ	15 - 30 cm	10 m
理論段数	10000	20000
充填剤直径	3 - 10 $\mu$ m	
試料注入量	1 - 10 $\mu$ L	< 1 $\mu$ L
温度	35 - 100 $^{\circ}$ C	35 - 200 $^{\circ}$ C
流速	0.5 cm/s	1 cm/s
検出器	UV, FID, IR	FID, MS, UV, IR
圧力	80 - 400 atm	80 - 400 atm

Table 1-4 Applications of packed-column SFC to the separation of bio-products.

対象	カラム	移動相	検出	文献
カロテン異性体	ODS	CO <sub>2</sub> +メタノール	UV	44, 45
ステロイド	CN	CO <sub>2</sub>	FTIR	46
過酸化脂質	シリカ	CO <sub>2</sub> +エタノール	UV	47
脂肪酸メチルエステル	シリカ	CO <sub>2</sub>	光散乱	48
	NH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	UV	49
脂質劣化物	シリカ, ポリマー	CO <sub>2</sub>	UV	50
	C8, ポリマー	CO <sub>2</sub> +水	FID	51
トコフェロール	シリカ	CO <sub>2</sub> +エタノール	UV, IR	52
レモン油	シリカ	CO <sub>2</sub> +エタノール	UV	53
魚油	CN	CO <sub>2</sub>	FID	54
グレープフルーツ油	CN	CO <sub>2</sub>	FID	54
アルカロイド	シリカ, NH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +極性溶媒	UV	55
糸状菌脂質	ODS	CO <sub>2</sub>	FID, UV	56
	ODS	CO <sub>2</sub> +メタノール	UV	57
ステロールエステル	ODS	CO <sub>2</sub>	FID, UV	58

Table 1-5 Applications of capillary-column SFC to the separation of lipids.

対象	カラム	移動相、分離条件	検出	文献
魚油	5%phenyl-95%methylpolysiloxane 8-20m × 0.1mm × 0.4μm	CO <sub>2</sub> , 50-170 °C, 14-40 MPa 密度プログラミング	FID	59
バター、魚油	5%phenyl-95%methylpolysiloxane 5-10m × 0.05mm × 0.2μm	CO <sub>2</sub> , 150 °C, 14-38 MPa 圧力プログラミング	FID	60
食用油	polydimethylsiloxane、 16m × 0.1mm × 0.2μm	CO <sub>2</sub> , 80 °C, 11-32 MPa 圧力プログラミング	FID	61
脂肪酸エステル	硝酸銀担持イオン交換樹脂 (マイクロパックドカラム) 25-33cm × 0.25mm	CO <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> CN/iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH 75-115 °C, 22-36 MPa 温度圧力プログラミング	UV	62
植物油、魚油	硝酸銀担持イオン交換樹脂 (マイクロパックドカラム) 16-33cm × 0.25mm	CO <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> CN/iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH 70-105 °C, 22-32 MPa 温度、圧力プログラミング	UV	63-65

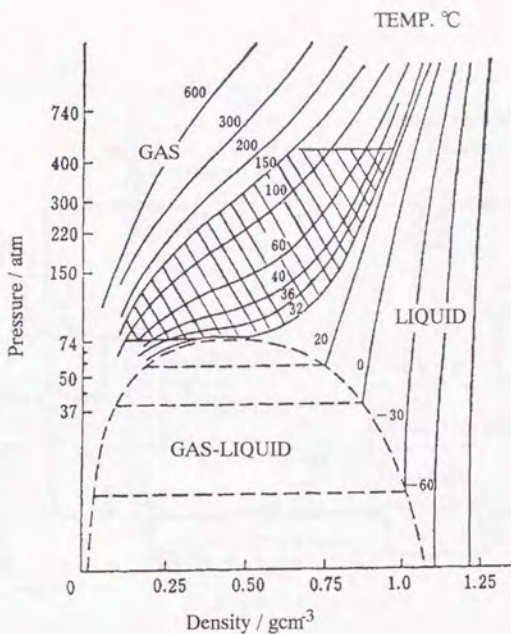


Fig. 1-1 Plot of pressure versus density with temperature as parameter of  $\text{CO}_2$ .

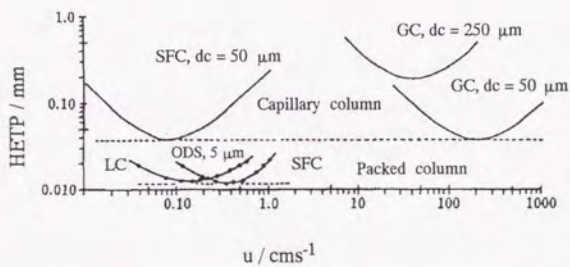


Fig. 1-2 Height equivalent to a theoretical plate (HETP) versus average linear velocity ( $u$ ) of GC, LC and SFC.

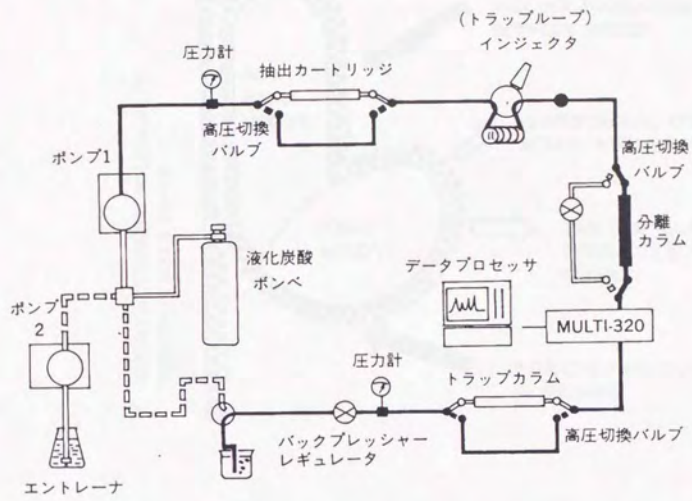


Fig. 1-3 SFE/SFC apparatus.



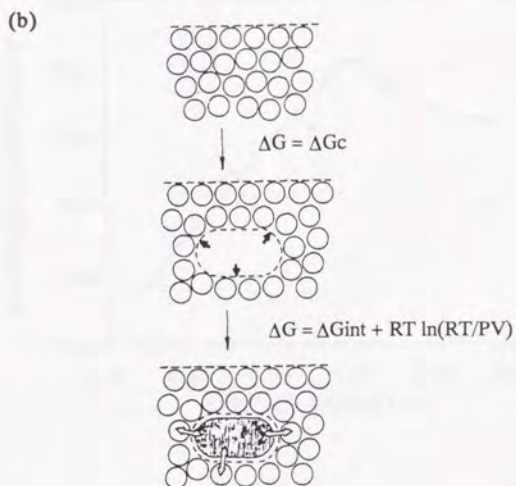
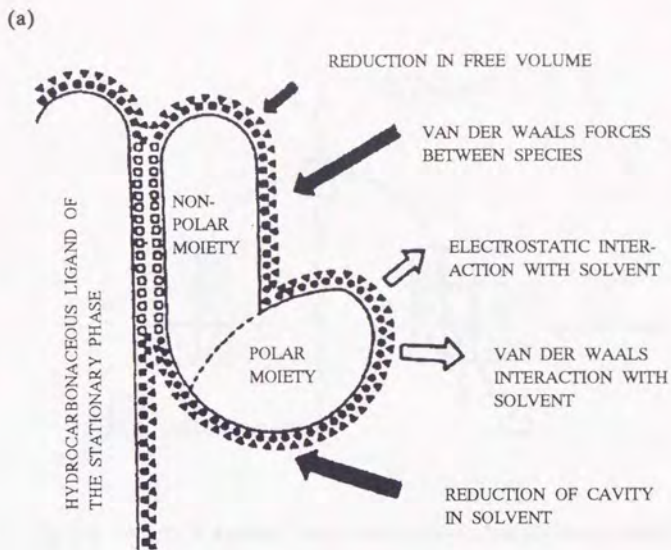


Fig. 1-4 Schematic illustrations of (a) the association between an amphiphilic solute and the hydrocarbonaceous ligand of the stationary phase and (b) placing a solute into a solvent in reversed-phase liquid chromatography.

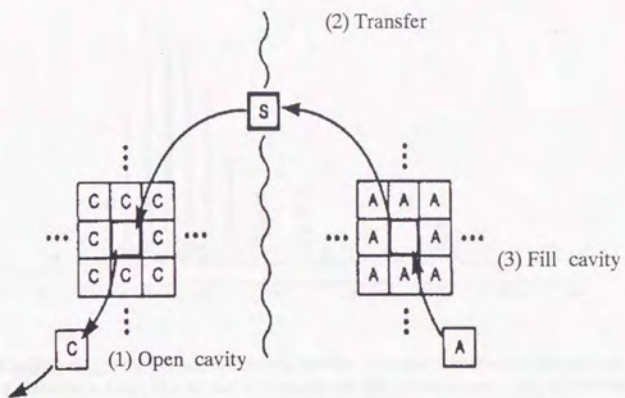


Fig. 1-5 Transfer of a solute S from mobile phase A into stationary phase C.

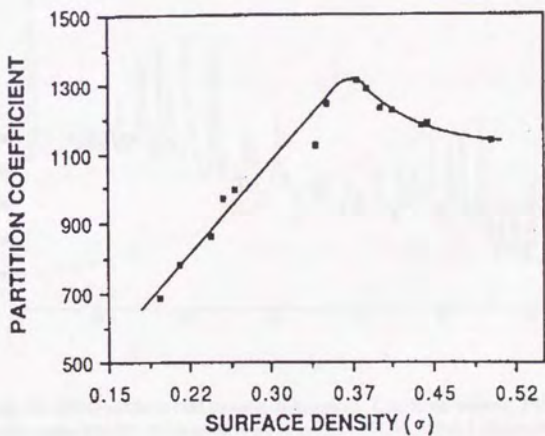


Fig. 1-6 Partition coefficient of *p*-terphenyl versus normalized surface density.  $\sigma=1$  corresponds to  $8.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ .

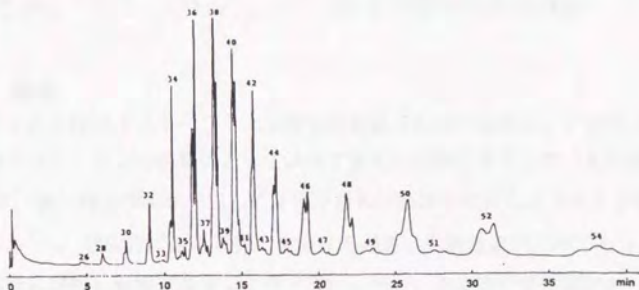


Fig. 1-7 Capillary GC profile of total butterfat triglycerides. Peaks are identified by their carbon number. Conditions: column, 10 x 0.3 mm I. D. coated with SE-30; carrier gas,  $H_2$  at 3 ml/min; temperature, programmed from 200 to 300  $^{\circ}C$  at 6  $^{\circ}C$ /min; detector, FID.

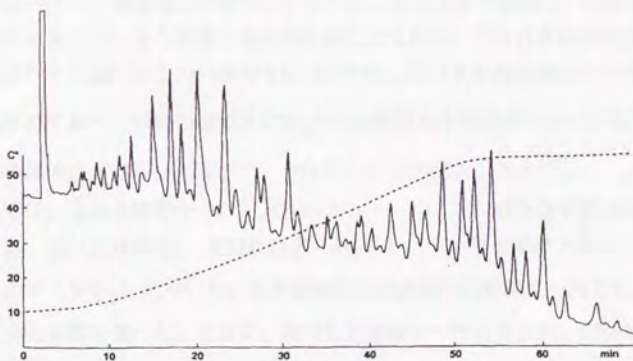


Fig. 1-8 RPLC profile of total butterfat triglycerides. Conditions: column, 250 x 4 mm I. D. LiChrospher 100 RP-18; eluent, acetone-acetonitrile (50:50, v/v) at 1 ml/min; temperature, programmed at 1  $^{\circ}C$ /min from 10 to 55  $^{\circ}C$ ; detector, differential refractometer.

## 第二章

### 超臨界CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O、CHF<sub>3</sub>、SF<sub>6</sub>による菌体油脂の抽出

#### 2-1 緒言

γ-リノレン酸やイコサペンタエン酸等の多価不飽和脂肪酸は、プロスタグランジンやロイコトリエンの前駆体として体内で重要な役割を果たしている物質である<sup>1,2)</sup>。近年、微生物の増殖を利用して多価不飽和脂肪酸を生産しようとする試みがなされている<sup>3,4)</sup>。微生物による脂質の生産はその速い生産速度が長所であり、また、植物のように環境に影響されることが少ない。現在、ある種の糸状菌がγ-リノレン酸を高濃度に蓄積することが見出されており、グルコースを炭素源として高密度培養ができることが知られている<sup>5)</sup>。従来γ-リノレン酸は月見草種子から抽出されていたが、この微生物による大量生産により安定な供給が可能になった。

超臨界流体抽出法(SFE: Supercritical Fluid Extraction)は、食品工業や医薬品産業の分野で最近注目を集めている手法であり、コーヒー豆の脱カフェイン、ホップからのフレーバーの抽出等に実用化されている。SFE法の特徴は、試料からの脱溶剤が減圧することにより容易に達成されることであり、これはまた超臨界流体クロマトグラフィー法のひとつの長所となっている。SFEの抽出媒体としてCO<sub>2</sub>がよく利用されており、脂質の超臨界CO<sub>2</sub>への溶解度も多数報告されている<sup>6-14)</sup>。しかし、他の媒体における溶解度のデータは少ないのが現状である<sup>15)</sup>。

本研究では、培養糸状菌からSFE法によりγ-リノレン酸を含有する油脂を抽出分離する。流体にはCO<sub>2</sub>、亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)、トリフルオロメタン(CHF<sub>3</sub>)、六フッ化硫黄(SF<sub>6</sub>)を用いた。糸状菌油脂の各流体への溶解度を測定し、また、温度、圧力の影響を調べた。さらに、抽出した油脂の中性脂質組成、脂肪酸組成を調べた。

#### 2-2 実験

##### 2-2-1 菌体油脂の生産

*Mortierella ramanniana* var. *angulispota* (IFO 8187) を既報の方法で培養した<sup>5)</sup>。3 L ジャーファーメンターを用い、温度303 K、グルコース濃度200 g/Lで、通気攪拌した。菌体は集菌後、オートクレーブを用い393 Kで10分間加熱した。これは、リパーゼを失活させ脂質の分解を防ぐためである。この加熱処理では、脂肪酸の変性は認められなかった。脂質は細胞内に蓄積されているが、これを抽出するには、細胞を破壊

する必要がある。この目的のためボールミルを用いた。菌体体積の二倍量のエタノールを加え、3時間破碎を行った。この段階で大部分の極性脂質と一部の中性脂質がエタノール中に抽出されるが、大部分の中性脂質は菌体中に残っている。また、菌体はエタノールの働きで脱水される。水が試料中に含まれていると、SFEにおいて抽出が阻害されるという報告があり<sup>16)</sup>、この抽出脱水操作はSFE法において有効であると言える。この破碎菌体を真空乾燥し、抽出サンプルとした。このサンプルの含水率は6 wt%で、また中性脂質、極性脂質含量はそれぞれ41.0、1.2 wt%であった。中性脂質は主に、遊離脂肪酸、ステロール、ジグリセリド、トリグリセリド、ステロールエステルで構成され、その重量比は1.1:6.4:6.2:82.5:3.7であった。また菌体脂質の脂肪酸組成はミリスチン酸1.3 wt%、パルミチン酸30.3 wt%、パルミトレイン酸1.3 wt%、ステアリン酸5.5 wt%、オレイン酸46.1 wt%、リノール酸8.5 wt%、 $\gamma$ -リノレン酸6.3 wt%、その他0.7 wt%であった。

### 2-2-2 超臨界流体抽出

超臨界流体抽出装置の概略をFig. 2-1に示した。抽出セルの容量は120 mLであり、圧力の設定は圧力調整弁 (No.8) で、流量の調節はニードルバルブ (No.12) で行った。使用ガス量はガスメーター (No.15) で測定した。20 gあるいは30 gのサンプルを正確に重量測定し、抽出セルに入れる。まずセル内を使用流体で大気圧下パージする。そして、出口バルブを閉め、目的の温度と圧力になるまで流体をセル内に送る。そのまま1時間放置した、ニードルバルブを開いて抽出を開始する。流体はニードルバルブの出口で大気圧に開放され、溶解していた油脂が析出する。油脂は試験管で受け、0.5~1.5 g程度蓄積したら、試験管を取り替える。各々の重量を測定し、また中性脂質組成、脂肪酸組成を測定した。

### 2-2-3 分析

中性脂質組成の測定には薄層クロマトグラフィー (TLC) 法を利用した<sup>17)</sup>。20 × 20 cm、コーティング厚さ0.25 mmのシリカプレートにサンプルをスポットし、まずベンゼン/ジエチルエーテル/エタノール/アンモニア水 (50:40:2:0.5, v/v) で12 cmまで展開する。次にヘキサン/ジエチルエーテル (94:6) で、端から1 cmのところまで展開する。硫酸を吹き付け加熱してスポットを炭化した後、デンストメータで中性脂質組成を測定した。また、脂肪酸組成の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。まず脂質を、0.5N 水酸化ナトリウム/メタノールおよび7%三フッ化ほう素で処理し、脂肪酸をメチルエステルにする<sup>18)</sup>。DEGSを20%担持したChromosorb WAWを充填したカラム (2 m × 3 mm I. D.) を用いて、このメチルエステルを分離分

析した。検出器にはFIDを用いた。

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 超臨界流体への油脂の溶解度

Fig. 2-2に超臨界CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O、CHF<sub>3</sub>、SF<sub>6</sub>を用いた場合の、抽出の経時変化を示した。抽出条件は、試料量20 g、温度333 K、圧力24.5 MPa、ガス流速 0.11 mol/minで行われた。N<sub>2</sub>Oが高い抽出力を示し、次にCO<sub>2</sub>が続く。しかし、超臨界CHF<sub>3</sub>とSF<sub>6</sub>はほとんど油脂を溶解しなかった。Fig. 2-2に示されるように、抽出初期でプロットは直線になる。抽出セルの中で抽出平衡が達成されているならば、この直線の傾きから溶解度が求められる。得られた溶解度をTable 2-1に示した。このCO<sub>2</sub>への溶解度は、報告されている天然油脂のCO<sub>2</sub>への溶解度と比較しても、大きな偏差はない<sup>19)</sup>。超臨界N<sub>2</sub>Oへの溶解度はCO<sub>2</sub>の場合の約5倍であり、CHF<sub>3</sub>、SF<sub>6</sub>への溶解度はN<sub>2</sub>Oの場合より3桁小さい。これらの四流体はともに無機物質であり、臨界温度も類似しているにもかかわらず、溶解度ではこのように大きな差が見られる。

最近、溶解パラメーターの概念が、超臨界流体の溶解力を説明するために使われている<sup>20,21)</sup>。溶解パラメーターは、凝集エネルギー密度の平方根と定義される。

$$\delta = (-E/V_1)^{1/2} \quad (2-1)$$

$E$ は液体から気体への蒸発エネルギー、 $V_1$ は液体のモル体積である。臨界点では、蒸発エネルギーは0になるため、超臨界流体の溶解パラメーターには上式は使うことが出来ない。そこで、超臨界流体の内部エネルギーを凝集エネルギーとして用いる方法がとられる。これはAlladaが報告した方法で、式2-2で与えられる<sup>20)</sup>。

$$\delta^2 = [(H^* - H) - RT(1-z)] / V \quad (2-2)$$

$H^*$ は標準エンタルピー、 $z$ は圧縮係数である。 $(H^* - H)$ はLee-Keslerの方法によって計算できる<sup>23)</sup>。Fig. 2-3に油脂の溶解度と各媒体の333 K、24.5 MPaにおける溶解パラメーターをプロットした。Fig. 2-3より、溶解パラメータが大きい方が溶解度も大きくなる傾向があることが分かる。溶解パラメーターの概念では、その値の接近している物質ほど相互に溶解しやすくなる。油脂の溶解パラメーターは通常これらの超臨界流体よりも大きい(例えば、トリステアリンはおおよそ9-10 (cal/cm<sup>3</sup>)<sup>1/2</sup>である<sup>23)</sup>)ので、超臨界流体の溶解パラメーターが溶質の溶解パラメーターに近づくほど溶解度は大きくなるといえる。しかしながら、CO<sub>2</sub>とN<sub>2</sub>Oの物理的特性は似ており、

同じ温度、圧力ではその溶解パラメーターはほぼ同じであるが、 $N_2O$ の方が大きい溶解力を示している。これは、溶質と溶媒の親和力が $CO_2$ と $N_2O$ で異なるためだと考えられる。溶質と溶媒間の分子間力が分散力だけの場合は、溶解パラメーターを用いて溶解度の定量的な議論が可能であるが、水素結合、双極子相互作用のような特別な分子間力が働く場合には、溶解パラメーターは不正確になる。これは、モデルとしている正則溶液がランダム混合を仮定しており、エントロピー効果を考慮していないこと、異種分子間の分子間力が各分子の分子間力の幾何平均で表されると見なしていることに由来する。 $N_2O$ は双極子モーメントを持っており(0.2 debyes)、脂質との相互作用に分散力以外の分子間力が作用していることを示している。

またガス流速と抽出効率について調べた。流速が大きい場合、抽出セルの中で溶解が平衡に達せず、低い溶解度になる可能性がある。Fig. 2-4に流体中の油脂の濃度と抽出率の関係を示した。抽出は、温度333 K、圧力24.5 MPa、流速2.0、5.0、8.4 g- $CO_2$ /minで行われた。流速8.4 g/minの時の曲線は2.0、5.0 g/minの場合の曲線よりも下に位置する。即ち十分平衡に達していないことを表している。しかし2.0、5.0 g/minの曲線はほぼ一致しており、ほぼ平衡になっているものと考えられる。Fig. 2-4はまた、抽出効率は抽出が進むに従い低下することを示している。これは菌体粒子内の物質移動抵抗が原因と考えられる。表面付近の油脂は容易に抽出されるが、中心に近い部分の油脂は抽出されにくい。同様な結果が、植物種子油、魚油の超臨界抽出についても報告されている<sup>7,24)</sup>。

### 2-3-2 溶解度におよぼす温度圧力の影響

菌体油脂の超臨界 $CO_2$ 、 $N_2O$ への溶解度を温度、圧力を変えて測定し、その結果をFig. 2-5に示した。同じ温度、圧力では超臨界 $N_2O$ への溶解度は $CO_2$ の5~12倍になっている。また、溶解度は圧力の増大とともに大きくなる。同じデータを、等圧条件下の溶解度と温度の関数としてFig. 2-6にプロットした。24.5 MPa以下の圧力では、等圧条件下で温度が上昇すると溶解度は減少する。この傾向は圧力が低いほど顕著である。一方、29.4 MPaでは温度に依らずほぼ一定の溶解度を示している。これは、温度が溶解度に対し相反する2つの効果を持っていることに由来する<sup>25,26)</sup>。一つは、温度が上昇すると溶質の蒸気圧が上昇し、その結果溶解度が増大する。一方、温度の上昇により流体の密度が減少し、流体の溶解力が減少する。本実験の範囲では、25 MPa以下の圧力で、密度の減少による影響の方が優勢になっている。

沸点の低い溶質の場合、溶解現象は主に溶媒分子と溶質分子の相互作用によって生じる。従って、超臨界流体の溶解力は密度と密接な関係がある。そこで、溶解度と流体密度の関係をFig. 2-7に示した。同じ流体密度では、温度の高い方が溶解度が大きい。また同じ温度では、密度の大きい方が溶解度も大きくなる。このことから、超臨界抽出では、高い温度、高い密度で操作する方が有利であるといえる。ただし、高圧下では溶媒が溶質を排除しようとする力が強まり、逆に密度の増大によって溶解度が低下し、溶解度が密度の二次関数になることが報告されている<sup>27)</sup>。実際の操作温度、圧力は装置の耐性、ポンプ性能に依存することになる。

### 2-3-3 抽出油の組成の変化

Fig. 2-8に、抽出物の中性脂質組成の変化を、抽出率に対してプロットした。抽出は温度333 K、圧力24.5 MPaで行った。抽出初期ではトリグリセリドの濃度は原料のそれよも小さいが、抽出率とともに増大していく。一方、遊離脂肪酸やジグリセリドは抽出初期で濃度が高く、抽出が進むに従い濃度が減少して行く。即ち、分子量の小さい成分ほど抽出されやすいことが分かる。同様な結果は、他の文献にも報告されている<sup>13,28)</sup>。

また、脂肪酸組成の変化についても測定し、これをFig. 2-9に示した。オレイン酸濃度は、抽出率とともに少しずつ増大する。一方、パルミチン酸濃度は逆に減少する。また $\gamma$ -リノレン酸濃度はほとんど変化しない。このことから、SFEだけでは $\gamma$ -リノレン酸の濃縮は困難であることが分かる。中性脂質中の特定の脂肪酸を濃縮するには、クロマトグラフィー法等の他の分離手法が必要である。

### 2-4 結言

菌体 (*Mortierella ramanniana* var. *angulispora*) からの脂質の抽出を、超臨界CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O、CHF<sub>3</sub>、SF<sub>6</sub>を用いて行った。油脂の溶解度は、温度333 K、圧力24.5 MPaの条件で、N<sub>2</sub>Oで2.3 wt%、CO<sub>2</sub>で0.48 wt%、CHF<sub>3</sub>で0.0099 wt%、SF<sub>6</sub>で0.0012 wt%であった。油脂の溶解パラメーターに近い溶解パラメーターを持つ流体ほど溶解度が大きくなる。さらに、温度、圧力の影響について調べたところ、圧力15.7-29.4 MPa、温度313-353 Kで、N<sub>2</sub>Oではどの条件においてもCO<sub>2</sub>よりも高い溶解度を示した。同一温度圧力ではN<sub>2</sub>OとCO<sub>2</sub>の溶解パラメーターはほぼ同じであり、両者における溶解力の差は、流体と脂質との極性的相互作用の差によるものと思われる。また、この温度、圧力条件下では、一定温度では密度の高い方が、一定密度では温度の高い方が溶解度は大きくなった。



脂質のSFEにおいて、初期に低分子量の成分が抽出されやすい。また、抽出物の $\gamma$ -リノレン酸濃度は抽出の間変化せず、濃縮は困難であることが分かった。

## REFERENCES

- 1) Gibson, K.H., *Chem. Soc. Rev.*, **6**, 489 (1977).
- 2) Ackroyd, J., *Chem. Soc. Rev.*, **11**, 321 (1982).
- 3) Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H., Shinmen, Y., Yamada, H., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 237 (1989).
- 4) Yamada, H., Shimizu, S., Shinmen, Y., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 785 (1987).
- 5) Yokochi, T., Kamisaka, Y., Nakahara, T., Enoshita, L., Suzuki, O., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **38**, 37 (1989).
- 6) Friedrich, J. P., List, G. R., Heakin, A. J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 288 (1982).
- 7) Snyder, J.M., Friedrich, J. P., Christianson, D. D., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1851 (1984).
- 8) Eissler, R.L., Friedrich, J. P., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 764 (1988).
- 9) Taniguchi, M., Tsuji, T., Shibata, M., Kobayashi, T., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2367 (1985).
- 10) Bartle, K. D., Clifford, A. A., Jafar, S. A., Shilstone, G. F., *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **20**, 713 (1991).
- 11) Nillson, W. B., Hudson, J. K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 749 (1993).
- 12) Bamberger, T., Erickson, J. C., Cooney, C., Kumar, S. K., *J. Chem. Eng. Data*, **33**, 327 (1988).
- 13) Brunetti, L., Daghetta, A., Fedeli, E., Kikic, I., Zanderighi, L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 209 (1989).
- 14) Hamman, H., *J. Supercrit. Fluids*, **5**, 101 (1992).
- 15) Brunner, G., Peter, S., *Sep. Sci. Technol.*, **17**, 199 (1982).
- 16) Sako, T., Yokochi, T., Sugeta, T., Nakazawa, N., Hakuta, T., Suzuki, O., Sato, M., Yoshitome, H., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **35**, 463 (1986).
- 17) Jigami, Y., Suzuki, O., Nakasato, S., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **28**, 867 (1979).
- 18) Metcalf, L. D., Schmitz, A. A., *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961).
- 19) del Valle, J. M., Aguilera, J. M., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **27**, 1551 (1988).
- 20) Allada, S. R., *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **23**, 344 (1984).
- 21) Ikushima, Y., Goto, T., Arai, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 4145 (1987).
- 22) Lee, B. I., Kesler, M. G., *AIChE J.*, **21**, 510 (1975).
- 23) Barton, A. F. M., "CRC handbook of solubility parameters and other cohesion parameters", CRC Press, Boca Raton, Florida (1983).

Table 2-1. Critical conditions and characteristics of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CHF<sub>3</sub> and SF<sub>6</sub>, and oil solubilities in these fluids.

fluid	Tc (K)	Pc (MPa)	characteristic	oil solubility <sup>a)</sup> (wt%)
CO <sub>2</sub>	304.2	7.37	nontoxic	0.48
N <sub>2</sub> O	309.6	7.24	narcotic, oxidizer	2.3
CHF <sub>3</sub>	299.1	4.83	stable	0.0099
SF <sub>6</sub>	318.7	3.76	insulating	0.0012

<sup>a)</sup> See Fig. 2-2 for extraction conditions.

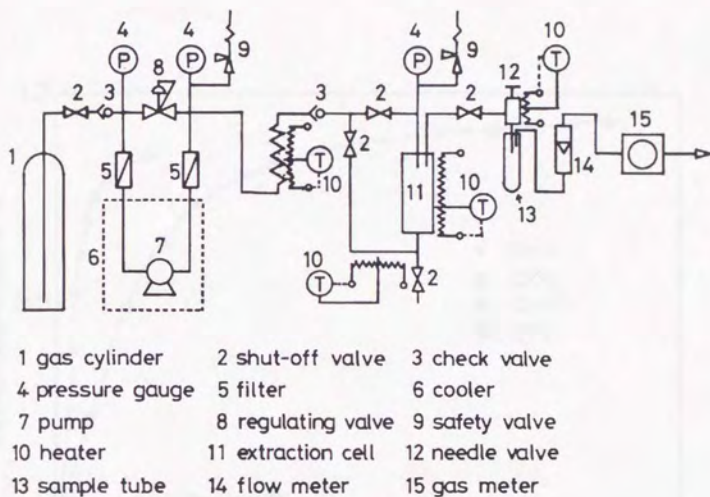


Fig. 2-1 Supercritical fluid extraction apparatus

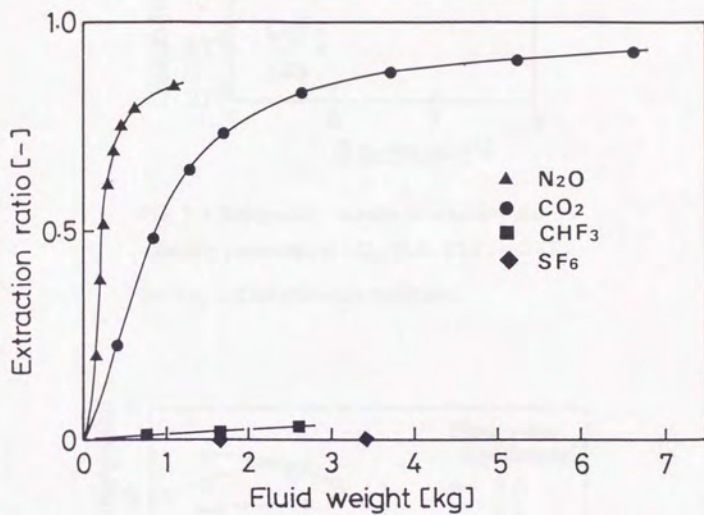


Fig. 2-2 Relationship between extraction ratio and weight of consumed fluids.  
 Extraction conditions: temperature, 333 K; pressure, 24.5 MPa; sample weight, 20.0 g  
 (lipids 8.4 g); flow rate, 0.11 mol/min.

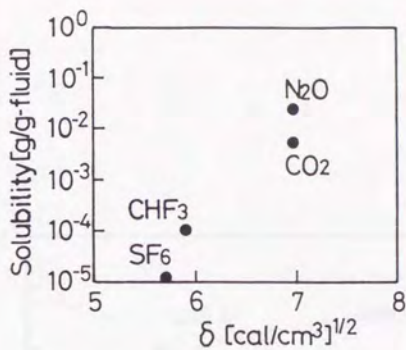


Fig. 2-3 Relationship between oil solubility and solubility parameters of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CHF<sub>3</sub> and SF<sub>6</sub>.

See Fig. 2-2 for extraction conditions.

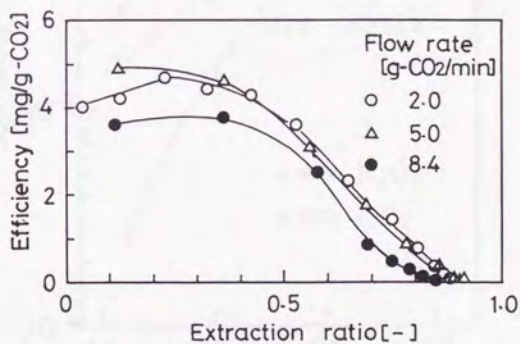


Fig. 2-4 Change in extraction efficiency with extraction ratio at the flow rates of 2.0, 5.0 and 8.4 g/min. Extraction conditions: fluid, CO<sub>2</sub>; temperature, 333 K; pressure, 24.5 MPa; sample weight, 20.0 g.

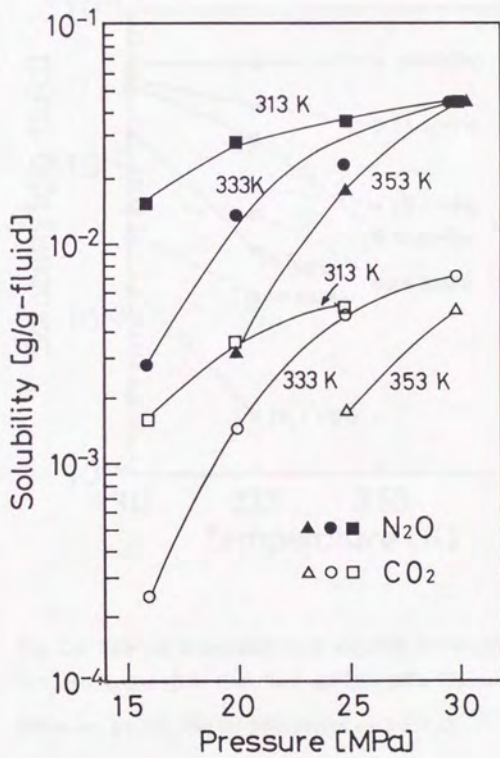


Fig. 2-5 Effect of pressure on oil solubility in supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O at 313, 333 and 353 K.

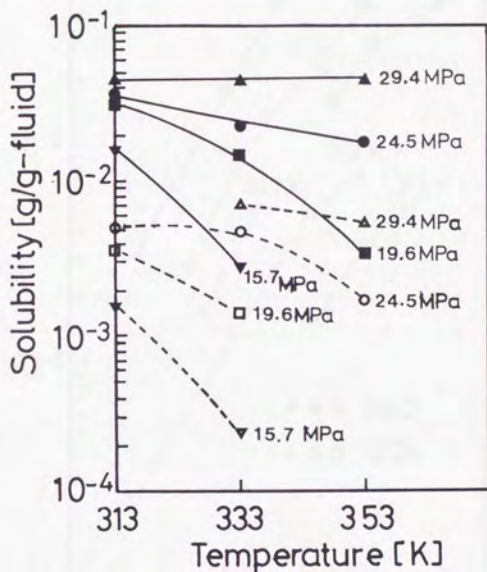


Fig. 2-6 Effect of temperature on oil solubility in supercritical  $CO_2$  and  $N_2O$  at 15.7, 19.6, 24.5 and 29.4 MPa. The dashed curves are for  $CO_2$  and the solid curves are for  $N_2O$ .



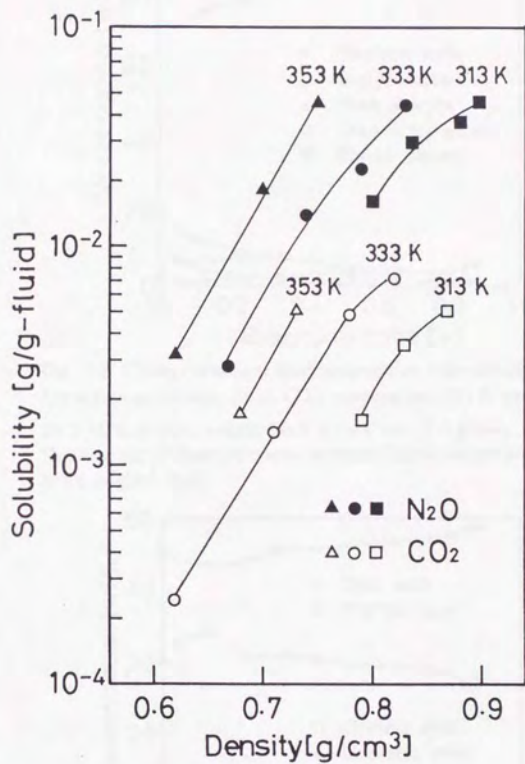


Fig. 2-7 Relationship between oil solubility and fluid density at 313, 333 and 353 K.

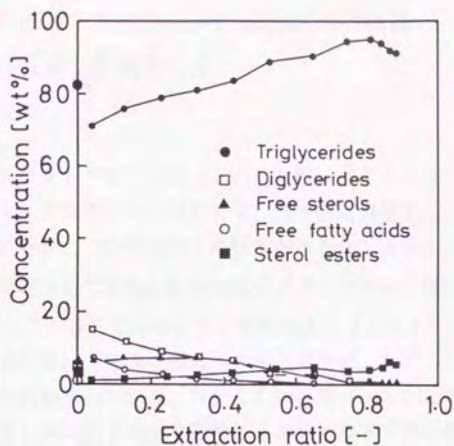


Fig. 2-8 Change in neutral lipid composition with extraction ratio. Extraction conditions: fluid, CO<sub>2</sub>; temperature, 333 K; pressure, 24.5 MPa; sample weight, 20.0 g; flow rate, 2.0 g/min. Keys on the ordinate represent the neutral lipid composition in the original lipid.

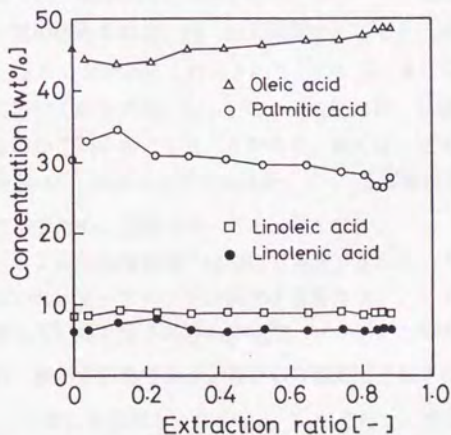


Fig. 2-9 Change in fatty acid composition with extraction ratio. See Fig. 2-8 for extraction conditions. Keys on the ordinate represent the fatty acid composition in the original lipid.

### 第三章

#### 超臨界流体クロマトグラフィーにおける保持機構

—  $\beta$ -カロテンを例として —

##### 3-1 緒言

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は、ガスクロマトグラフィー (GC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の中間に位置するクロマトグラフィーである。SFCの特徴については多くの報告があるが、カラムとしてキャピラリー、充填剤ともに使用されており、生体物質やポリマー等の分離に適用されている<sup>1,2)</sup>。キャピラリーカラムSFCはGCと、また充填カラムSFCはHPLCと比較して論じられることが多い。実際充填カラムSFCでは、HPLCで用いられている充填剤が一般的に流用されている。HPLCの分離モードとして逆相と順相があり、前者では非極性な固定相と極性な移動相を用い、後者では極性な固定相と非極性な移動相を用いる。HPLCにおける保持のメカニズムは、多くの研究者によって実験的理論的に論じられている<sup>3-13)</sup>。SFCではオクタデシル基結合 ( $C_{18}$ 、ODS) シリカ等の逆相系充填剤、シリカゲル等の順相系充填剤がともに用いられているが、その分離機構についてはほとんど考察されていない<sup>14-17)</sup>。既往の研究によると、SFCにおける溶質の保持挙動は、同一の充填剤であっても、HPLCとは全く異なっている<sup>17-19)</sup>。SFCが今後広く利用されるためには、SFCとHPLCの分離挙動の違いが何に基づくのか明確にし、どのような固定相、移動相特性がSFCの分離に重要であるのかを明らかにする必要がある。例えば、逆相LCで最も広く用いられている充填剤は $C_{18}$ 結合シリカであるが、 $CO_2$ を移動相とするSFCでは、両相とも非極性であるため、逆相のモードとは言えない。

本研究では、SFCの分離機構 について考察するため、プローブ分子として $\beta$ -カロテンを用いた。 $\beta$ -カロテンは炭化水素系カロテノイドの一つであり、動植物界に広く分布している。分子式は $C_{40}H_{56}$ で、イソプレンの共役により可視領域に吸収を持つため、検出が容易である。SFCの固定相として $C_{18}$ シリカ、アミノ基結合 ( $NH_2$ ) シリカ、移動相として $CO_2$ 、 $N_2O$ を用い、溶質保持における固定相、移動相の役割について検討する。 $N_2O$ は脂質に対して強い親和性を示し<sup>20,21)</sup>、また極性が $CO_2$ よりも大きいため、保持に重要となる移動相特性を調べるのに都合が良い。SFCでは溶質の移動相への溶解度が重要と言われているので、

まず、 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ への $\beta$ -カロテンの溶解度を測定する。 $\text{CO}_2$ への $\beta$ -カロテンの溶解度については報告されているが<sup>(22)</sup>、 $\text{N}_2\text{O}$ への溶解度は報告されていない。溶解度を一つの指標として、SFCにおける $\beta$ -カロテンの溶出挙動を論じる。さらに極性充填剤、非極性充填剤を用いて脂肪酸エステルを分離し、その分離挙動を比較した。

## 3-2 実験

### 3-2-1 $\beta$ -カロテンの溶解度

装置の概略をFig. 3-1に示す。測定系は抽出部とクロマト部から成る。用いた $\beta$ -カロテンの純度は96% (Sigma製)である。まず $\beta$ -カロテンをヘキサンに溶解し、その溶液を直径2mmのアルミナビーズとともにエバポレイトした。 $\beta$ -カロテンは非晶状態でアルミナ粒子表面に担持される。この粒子を内径8mm、長さ200mmのステンレスパイプに充填し、抽出セルとする。抽出圧は、背圧調節弁で設定し、流速はメータリングバルブで調節した。本実験では、ガス流速を約50 mL/minに設定したが、これは抽出セル内の滞留時間30~50分に相当する。 $\beta$ -カロテンで飽和した流体は、6方バルブに取り付けられたループを通過する。バルブの切り替えにより、ループ中の流体はクロマト部に導入される。ループは、 $\text{CO}_2$ を用いる場合は100  $\mu$ L、 $\text{N}_2\text{O}$ を用いる場合は20  $\mu$ Lの容積のものを用いた。抽出セル、ループは、温度 $\pm 0.1$  Kで制御できるオープン中に置かれている。クロマト部に導入されたループ中の流体は充填カラムを通過し、UV検出器でその吸光度が測定される。 $\beta$ -カロテンの濃度は、得られたクロマトグラフのピーク面積から次のように計算した。既知の濃度の $\beta$ -カロテン/クロロホルム溶液を数種調製し、それを上述の20  $\mu$ Lループに注入し、クロマト部に導入する。得られたピーク面積と $\beta$ -カロテン濃度の検量線を作製し、それを超臨界流体中の溶解度の測定に適用した。また、超臨界 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ の密度には既報の実験データを用いた<sup>(23,24)</sup>。

このようにクロマトグラフィーを用いるのは、 $\beta$ -カロテンの純度をチェックするためである。 $\beta$ -カロテンは熱、光に対して不安定であるので、生じた異性体、分解生成物が吸光度に影響を与える可能性があるためである。クロマト条件は、移動相： $\text{CO}_2$ 、温度：40  $^{\circ}\text{C}$ 、圧力：19.6 MPa、カラム：Cosmosil C18-AR (5  $\mu$ m, 150  $\times$  4.6 mm I. D.、半井化学製)、流速：2.5 g/min、測定波長450 nmである。

また、 $\beta$ -カロテンの固体状態（結晶形、非晶形）の違いによる溶解度の違いを

考察するため、示差走査熱量計 (Perkin-Elmer DSC7)を用いて、結晶、非晶 $\beta$ -カロテンの融点、融解エンタルピーを測定した。

### 3-2-2 $\beta$ -カロテンのSFCにおける保持挙動測定

装置にSFC装置SUPER-100 (日本分光製)を用いた (Fig. 1-3 参照)。耐圧セル付きのUV/vis検出器を用い、450nmで $\beta$ -カロテンを検出した。カラムには、Inertsil ODS (エンドキャッピング処理済、モノメリックタイプ、粒径 $5\mu\text{m}$ ,  $150\times 4.6\text{mm}$  I.D., GLサイエンス製)、Cosmosil C18-AR (エンドキャッピング処理済、ポリメリックタイプ、粒径 $5\mu\text{m}$ ,  $150\times 4.6\text{mm}$  I.D., 半井化学製)、W2-100P (エンドキャッピング処理済、ポリメリックタイプ、粒径 $5\mu\text{m}$ ,  $150\times 4.6\text{mm}$  I.D., 日本ケミカル製)、Cosmosil  $\text{NH}_2$  (粒径 $10\mu\text{m}$ ,  $150\times 4.6\text{mm}$  I.D., 半井化学製)、Super  $\text{NH}_2$  (粒径 $10\mu\text{m}$ ,  $150\times 4.6\text{mm}$  I.D., 日本分光製)を用いた。移動相として、 $\text{CO}_2$ と $\text{N}_2\text{O}$ を用いた。温度308、313、318、323 K、圧力10~30 MPaで行った。流速は約 $2.6\text{g/min}$ に設定した。サンプルには $\beta$ -カロテン (純度96%, Sigma製)をヘキサンに溶解して、インジェクターを用いてクロマトグラフに導入した。

### 3-2-3 極性充填剤、非極性充填剤における脂肪酸エステル分離

魚油 (日本油脂製)をメチルエステル化したものをサンプルとして、非極性および極性充填剤におけるSFCの分離挙動を調べた。カラムにInertsil ODS、Cosmosil C18-ARを用い、移動相として $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CO}_2$ を用いた。検出器にはFID (Shimadzu 9AM)を用いた。これは $\text{N}_2\text{O}$ は低紫外領域に吸収を持つため、UVによる脂肪酸の検出が出来ないためである。分離カラムの出口に三方ジョイントを取り付け、一方は背圧バルブに繋ぎ、他方は先端をテーパーに絞った溶融シリカキャピラリーに繋ぐ。流体の一部 (ガスにして数十 $\text{mL/min}$ )はキャピラリー内を通りFIDに導入される。

## 3-3 結果と考察

### 3-3-1 $\beta$ -カロテンの $\text{CO}_2$ と $\text{N}_2\text{O}$ への溶解度

得られた溶解度データをTable 3-1及びFig. 3-2に示した。実験の再現性は $\pm 10\%$ 内であった。また、圧力が小さいところでは溶解度が小さく、測定誤差が大きくなった。同じ温度圧力では、 $\text{N}_2\text{O}$ は $\text{CO}_2$ よりも高い溶解度を与える。二章で示したように、菌体油脂に対して $\text{N}_2\text{O}$ は $\text{CO}_2$ よりも高い溶解力を示すが、溶質が $\beta$ -カロテンの場合でも同様であった。

Chrastilは超臨界流体への溶解度を表す式として、次式を提案した<sup>25)</sup>。

$$\ln S = k \ln \rho - \Delta H/RT + q - \ln([1000M_B]^k[M_A + kM_B]) \quad (3-1)$$

ここで、 $S$ は溶解度、 $\rho$ は流体の密度、 $k$ は1個の溶質に会合する溶媒の分子数、 $\Delta H$ は、溶解のエンタルピーで、溶質の蒸発のエンタルピー ( $\Delta H_{\text{vap}}$ ) と、会合のエンタルピー ( $\Delta H_{\text{solv}}$ ) の和である。 $q$ は定数、 $M_A$ 、 $M_B$ はそれぞれ溶質の分子量、溶媒の分子量である。即ち、溶解度は温度と密度の関数となる。

Fig. 3-3は一定密度における溶解度と温度の逆数の関係を表す。直線の傾きから式3-1のエンタルピー値が得られる。また溶解度と密度の関係を図3-4に示した。溶解度の対数と密度の対数は直線関係となり、その傾きから $k$ 値が得られる。それらの値をTable 3-2に示す。これらの値を用い、定数項 $b = q - \ln([1000M_B]^k[M_A + kM_B])$ を、実験値との偏差が最小になるように決定した。

超臨界 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ への $\beta$ -カロテンの溶解度は次式で表された。

$$\ln(S(\text{g m}^{-3})) = 9.3 \ln(\rho(\text{kg m}^{-3})) - 7.2 \times 10^4/RT - 34.28 \quad (\text{in CO}_2) \quad (3-2)$$

$$= 10.9 \ln(\rho(\text{kg m}^{-3})) - 6.3 \times 10^4/RT - 45.93 \quad (\text{in N}_2\text{O}) \quad (3-3)$$

Fig. 3-4中には、Cygnarowiczのデータも示した。313、333 Kにおける彼らのデータは、式3-2で予想される値よりも小さくなっている。この原因として、彼らは結晶の $\beta$ -カロテンを用いていることが考えられる。また、彼らは流体中の濃度を直接その吸光度で測定しているため、異性化、分解が生じた場合、誤った値を与える可能性がある。

溶質が固体の場合、蒸発のエンタルピーは、昇華のエンタルピーであり、それは、融解のエンタルピーと蒸発（液→気）のエンタルピーの和で表される。Table 3-3は結晶、非晶 $\beta$ -カロテンの融点、融解エンタルピーを表す。結晶 $\beta$ -カロテンは、ベンゼン-メタノールから再結晶して得られた。結晶形の方が高い融解エンタルピーを示している。このことは、結晶 $\beta$ -カロテンの溶解度は、式3-2、3-3で示される値と異なることを示している。

### 3-3-2 一定温度における保持の密度依存性

Figs. 3-5、3-6に313 Kにおける $\beta$ -カロテンの保持比と移動相密度の関係を示した。この実験におけるカラムの圧力損失は、粒径 $5 \mu\text{m}$ の充填剤で2.0 MPa、 $10 \mu\text{m}$ の充填剤で0.6-0.8 MPaであった。そこでカラムの入口と出口の密度の加算平均を代表密度として採用した。保持比の対数は密度の対数に対して直線的に変化した。また移動相が $\text{N}_2\text{O}$ の場合、同じ密度条件では、保持比は $\text{CO}_2$ の場合よりも低下する。また、

C O<sub>2</sub>とN<sub>2</sub>Oで生じる保持比の差は、NH<sub>2</sub>充填剤よりもC<sub>18</sub>充填剤で大きい。

この保持比の違いを説明するため、移動相の溶解力と保持比の関係を調べた。Figs. 3-7, 3-8にそれぞれ、C<sub>18</sub>充填剤、NH<sub>2</sub>充填剤におけるβ-カロテンの保持比と溶解度の関係を示した。各C<sub>18</sub>カラムでは、移動相の種類にかかわらず、log *k'* vs. log *S* プロットは一本の直線として表される。一方、各NH<sub>2</sub>カラムでは、保持比は移動相の種類に依存し2本の直線となった。即ち、C<sub>18</sub>カラムでは溶質の保持は移動相の溶解度に支配されるが、NH<sub>2</sub>カラムでは溶質の保持は溶解度だけでは説明できない。

### 3-3-3 一定密度における保持の温度依存性

非極性充填剤、極性充填剤における保持機構についてさらに調べるため、SFCにおける溶質の保持の温度依存性を調べた。Figs. 3-9, 3-10に一定密度における保持比の対数と温度の逆数をプロットした。得られたプロットは直線となり、この傾きは溶質の移動相から固定相への移動のエンタルピーに関係付けられる。Rothによると、一定密度における*k'* vs. 1/*T*プロットの傾きはおよそ次式のように表される<sup>26)</sup>。

$$\left[ \frac{\partial \ln k'}{\partial (1/T)} \right]_{\rho} = -(\Delta H_1 - T\gamma_{mv}\Delta V_1)/R \quad (3-4)$$

ここでΔ*H*<sub>1</sub>は溶質の移動のモルエンタルピーであり、Δ*V*<sub>1</sub>は溶質の移動の際のモル体積変化である。γ<sub>mv</sub>は(∂*P*/∂*T*)<sub>ρ</sub>で表されるthermal pressure係数である。Δ*H*<sub>1</sub>を見積るのは難しいので、見かけのエンタルピー-Δ*H*<sub>1</sub><sup>app</sup>(= Δ*H*<sub>1</sub> - *T*γ<sub>mv</sub>Δ*V*<sub>1</sub>)として考える。密度800 kg/m<sup>3</sup>における各カラムでのβ-カロテンの保持比と見かけのエンタルピーをTable 3-4に示した。C<sub>18</sub>カラムでは-Δ*H*<sub>1</sub><sup>app</sup>の値は移動相がN<sub>2</sub>OとC O<sub>2</sub>で11-16 kJ/molの差がある。一方、NH<sub>2</sub>カラムでは-Δ*H*<sub>1</sub><sup>app</sup>の値はN<sub>2</sub>OとC O<sub>2</sub>とでほとんど同じであった。この結果は非極性、極性充填剤におけるSFCでの保持機構の違いを明かに示している。

またΔ*H*<sub>1</sub><sup>app</sup>とΔ*H*<sub>1</sub>の違いは次のように見積ることが出来る。本研究の実験範囲(ρ = 800 kg/m<sup>3</sup>, 308 < *T* < 328 K)では、γ<sub>mv</sub>の値はN<sub>2</sub>O、C O<sub>2</sub>ともに約0.5 MPa/Kとなる。またβ-カロテンのモル体積は537 × 10<sup>-6</sup> m<sup>3</sup>/molである<sup>22)</sup>。それで1%のモル体積の変化は0.9 kJ/molのエンタルピー差となる。

### 3-3-4 非極性固定相の保持機構

Horvathらはsolvophobic理論に基づき、逆相L Cの保持機構を表した<sup>4,5)</sup>。彼らは溶質分子と炭化水素リガンドとの会合として2つのプロセスを考えた。一つは仮想気体中での溶質とリガンドの相互作用でその自由エネルギー変化を $\Delta G^{\circ}_{vdw}$ で表す。もう一つは溶質の移動相から固定相への移動プロセスで2段階に分けられる。移動相に溶質サイズの空間を形成する過程と、溶質と溶媒分子との相互作用である。溶質移動の自由エネルギー変化は、次のように表される。

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ}_{vdw} - \Delta G^{\circ}_c - \Delta G^{\circ}_{int} - RT \ln \left( \frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (3-5)$$

ここで $\Delta G^{\circ}_c$ は移動相中に溶質サイズの空間を形成するための自由エネルギー変化であり、正の値をとる。 $\Delta G^{\circ}_{int}$ は溶質と溶媒分子との相互作用に関する自由エネルギー変化であり負の値をとる。最後の項は、自由体積の変化によるエントロピー変化を示す。 $P_0$ は圧力、 $V$ は溶媒の分子体積を表す。Horvathは $\Delta G^{\circ}_c$ を次のように表した。

$$\Delta G^{\circ}_c = N A_s \gamma (\kappa^e - 1) + N \Delta A_x \gamma \quad (3-6)$$

ここで $N$ はアボガドロ数、 $\gamma$ は表面張力、 $\Delta A_x$ は溶質とリガンドの会合による表面積の変化、 $A_s$ は溶媒分子の表面積、 $\kappa^e$ は表面張力を分子の次元にあわせるための因子である。かれらの理論では、 $\Delta G^{\circ}_{vdw}$ は他の項に較べて無視できるとされた。液体の表面張力は温度の上昇とともに減少し、臨界温度で0になる。そのため式3-6は超臨界流体には適用できない。超臨界流体中に空間をつくるエネルギーはその凝集エネルギーに関係付けられる。超臨界流体の凝集エネルギーは温度圧力に依存し、状態方程式を用いて計算できる<sup>27,28)</sup>。密度の増大とともに $\Delta G^{\circ}_c$ は増大し、 $\Delta G^{\circ}_{int}$ は減少する(負に大きくなる)。本実験の温度圧力範囲では、 $\beta$ -カロテンの保持は移動相密度の増大によって減少する。このことは、SFCでは式3-5中で $\Delta G^{\circ}_{int}$ が支配的であることを示している。一般に液体は大きい凝集エネルギー密度を持っており、例えば、温度293 Kでヘキサンは225 MPa、エタノールは887 MPaであり、逆相LCにおいて $\Delta G^{\circ}_c$ が重要になる<sup>29)</sup>。またSFCにおいても、高圧では $\Delta G^{\circ}_c$ が重要にな



ると予測できる。Martireらは格子理論に基づき、SFCの保持を表す一般式を導出した<sup>30-33</sup>。超臨界流体を移動相とする分配クロマトグラフィーにおける溶質の保持は還元密度の二次関数で表される。

$$\ln K = \ln K_0 + F(T_R, \rho_R) \quad (3-7)$$

$$\ln K_0 = \left(\frac{r_a}{r_b}\right)\left(\frac{r_b}{r_d} - r_b\right) + \frac{(1 + \sqrt{r_b})^2}{T_R} \left(\frac{r_a}{r_b}\right)\left(\frac{\epsilon_{ad}}{\epsilon_{bb}} - \frac{\epsilon_{dd}}{2\epsilon_{bb}}\right) \quad (3-8)$$

$$F(T_R, \rho_R) = \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \left[ (\sqrt{r_b} - 1) \rho_R - (\sqrt{r_b} + 1) \left(\frac{\epsilon_{ab}}{\epsilon_{bb}}\right) \left(\frac{\rho_R}{T_R}\right) + \left(\frac{\rho_R^2}{2T_R}\right) \right] \quad (3-9)$$

ここで $\rho_R$ は還元密度、 $T_R$ は還元温度、 $r_i$ は分子 $i$ のセグメント数、 $\epsilon_{ij}$ は分子 $i$ と $j$ の間の近接セグメント間の相互作用エネルギー、添字の $a$ 、 $b$ 、 $d$ はそれぞれ溶質、溶媒、固定相を示す。式3-9で右辺第2項は溶媒-溶質間相互作用による項であり、密度の増大によって保持を低下させる方向に働く。右辺第3項は溶質を溶媒から排除する力に関与し、密度の増大によって保持を大きくする方向に働く。式3-7、3-8、3-9より、高压では溶質の保持は密度の増加によって増大することを表している。また、超臨界流体への物質の溶解度が高压では減少することを示唆しており、実際に実験例が報告されている<sup>34,35</sup>。

逆相LCにおける移動相の保持への寄与として、溶質との相互作用に関する引力項と、溶媒分子同士の相互作用に基づいた斥力項がある(式3-5)。これは格子流体モデルを用いて導出されたSFCの保持を与える式3-9に対応している。LCでは斥力項が保持に重要な役割を果たすが、通常のSFCの圧力範囲では保持は密度の増大によって減少することから、SFCでは溶媒-溶質分子間相互作用に基づく引力項が支配的である。

Fig. 3-5が示すように、限られた密度範囲では、 $\log K$ は $\log \rho$ に対して直線的に変化する。この直線関係は溶解度の対数が密度の対数に対して直線的となる経験式によって説明できる。式3-1を簡単にして式3-10で表す。

$$\ln S = k \ln \rho - \frac{\Delta H_m}{RT} + C \quad (3-10)$$

式3-10は溶質1分子がk個の溶媒分子と会合して溶解するというモデルに基づいている。溶媒分子間の相互作用はここでは考慮されておらず、溶媒-溶質分子間の相互作用だけを考えている。もし、超臨界流体中の溶質の溶解度が、主に溶質分子と溶媒分子の相互作用に支配されるならば、式3-10に示されるように $\log S$ は $\log \rho$ に対して直線的に増大する。また、SFCにおける保持比と溶解度の関係はすでにBartleらによって与えられている<sup>18,36,37</sup>。

$$\ln k' = \ln \phi + \ln C_{st}^{\circ} + \frac{(\mu_{ss}^{\circ} - \mu_{st}^{\circ})}{RT} - \ln S \quad (3-11)$$

$$S = a_m^{\text{sat}} C_m^{\circ} \quad (3-12)$$

ここで $\phi$ はカラムの相比、 $C_{st}^{\circ}$ は固定相での標準濃度、 $\mu_{ss}^{\circ}$ は標準圧における純粋固体の化学ポテンシャル、 $\mu_{st}^{\circ}$ は無限希釈、標準濃度、圧力における固定相中での化学ポテンシャル、 $a_m^{\text{sat}}$ は溶媒中における溶質の飽和での活量、 $C_m^{\circ}$ は移動相中での溶質の標準濃度である。式3-11の右辺1、2、3項はカラム、溶質、温度が一定ならば密度に依存しない。式3-10、3-11から、SFCの保持の対数は密度の対数に対して直線になることが理解される。本実験の分離条件では、これらの式が成立していると言える。

もし固定相が移動相の種類や圧力に影響されないならば（例えば、溶媒分子の固定相への吸着や吸収が無視される時）、保持比は移動相の種類によらず、溶解度の関数となる。そこで式3-11の正当性を調べるため、 $\ln k'$  vs.  $\ln S$ プロットの傾きと切片を求めた( $\ln k' = a - b \ln S$ )。その結果をTable 3-5に示した。N<sub>2</sub>Oの場合 $b$ はCO<sub>2</sub>の場合よりも小さくなるが、傾きは1に近い。C<sub>18</sub>カラムでは、切片の値はN<sub>2</sub>O、CO<sub>2</sub>でほぼ同じである。したがって、Fig. 3-7に示されるように、溶解度と保持比のlog-logプロットは移動相の種類によらず一本の直線になる。一方、NH<sub>2</sub>カラムでは、N<sub>2</sub>Oで得られた切片の値はCO<sub>2</sub>での値よりも大きくなる。そのため移動相によって異なる直線が得られる。以上のことから、C<sub>18</sub>充填剤では、式3-11の右辺第2項で示される固定相の特性が、移動相の種類と圧力に影響されないことが実験によって示され、保持が溶解度に依存することから、SFCの分離メカニズムは吸着

ではなく、分配に近いと考えられる。一方、 $\text{NH}_3$ 充填剤では、固定相の特性が移動相の種類によって影響されることから、分離メカニズムは分配とは言えない。

$\beta$ -カロテンは非極性で固定相のリガンド（オクタデシル基）よりも大きい分子であることに注意する必要がある。極性基を持つ小分子が用いられた場合、充填剤シリカ表面の残留シラノール基の吸着効果によって、違った結果が得られたであろう。即ち、極性充填剤での結果のように、溶解度と保持のプロットは移動相の種類に依存する別々の直線となると思われる。

もし式3-5において、 $\Delta G^\circ$ が無視できるならば、SFCの保持比は次のように表される。

$$\ln k' = \ln \phi - \frac{\Delta G^\circ}{RT} = \ln \phi - \frac{\Delta G^\circ_{\text{vdw}}}{RT} + \frac{\Delta G^\circ_{\text{int}}}{RT} + \ln \left( \frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (3-13)$$

式3-13は非極性の固定相を用いるSFCの保持は、溶質と移動相、固定相との相互作用で表されることを示している。逆相LCでは $\Delta G^\circ$ が溶質の保持に重要な働きをしていると言われているが、SFCではこの項の寄与が小さいため、固定相の特性が溶質の保持に及ぼす影響はLCよりもSFCで大きくなる。実際、SFCでは溶質の保持が固定相の特性に敏感であるということが、報告されている<sup>38-41</sup>。

式3-5では、固定相と溶質の相互作用としてvan der Waals力だけが考慮されている。しかし、最近Dill, Dorseyらは逆相クロマトグラフィーの保持機構は分配であると主張している<sup>10,11,13,42-45</sup>。この理論により、リガンドの長さ、結合基の充填剤表面密度が保持に及ぼす影響をうまく説明することができる。分配モデルでは、クロマトの分配係数は次のように表される。

$$\ln K = \ln \frac{C_{\text{st}}}{C_{\text{m}}} = - \frac{\Delta H^\circ_{\text{t}}}{RT} + \frac{\Delta S^\circ_{\text{t}}}{R} \quad (3-14)$$

ここで $C_{\text{st}}$ と $C_{\text{m}}$ は固定相、移動相における溶質の濃度である。また式3-10, 3-11より

$$\ln k' = \ln \phi + \ln C_{\text{st}} - C \cdot k \ln \rho + \frac{\mu_{\text{ss}}^\circ - \mu_{\text{st}}^\circ}{RT} + \frac{\Delta H_{\text{m}}}{RT} \quad (3-15)$$

$(\mu_{\text{ss}}^\circ - \mu_{\text{st}}^\circ)$ は固体状態の溶質が固定相に移動する自由エネルギー変化である。この項は $(-\Delta H_{\text{st}}^\circ - T\Delta S_{\text{st}}^\circ)$ と書くことができる。 $\Delta H_{\text{st}}^\circ$ は3種類のエンタルピーを含んでいる。気化のエンタルピー、溶質とリガンドの相互作用に関するエンタルピー、固定相中に溶質サイズの空間を形成するエンタルピーである。溶質の移動相から固定相

への移動において、そのモル体積の変化が無視できるとすると（式3-4で $\Delta V_1 = 0$ ）、 $\Delta H_1$ は $\Delta H_1^{\text{app}}$ に等しくなる。従って、各カラムにおける $\Delta H_{\text{st}}^{\circ}$ の値は $\Delta H_1^{\text{app}}$ と $\Delta H_m$ から計算できる（ $\Delta H_{\text{st}}^{\circ} = \Delta H_m + \Delta H_1^{\text{app}}$ ）。計算された $\Delta H_{\text{st}}^{\circ}$ の値をTable 3-6に示した。N<sub>2</sub>OはCO<sub>2</sub>よりも大きい $\Delta H_{\text{st}}^{\circ}$ の値を与える。 $\Delta H_{\text{st}}^{\circ}$ は移動相に影響されないパラメーターであるが、計算値は移動相に依存している。これは、溶質の保持には影響が現れない程度であるが移動相の固定相への溶け込みや吸着があったこと、 $\Delta V_1$ が0と見なせないこと、等が原因と考えられる。

### 3-3-5 極性固定相の保持機構

Strubingerらは、超臨界、近臨界状態における様々な充填剤へのCO<sub>2</sub>の吸着等温線を測定した<sup>46-48</sup>。そして、臨界点に近い温度圧力では、多重層吸着が生じていることを示した。また実用的なSFCの温度圧力条件では、LCの場合と同じように、少なくとも移動相分子の単分子層で覆われていることを示した。順相LCの保持モデルでは、固定相に吸着していた移動相分子が溶質と入れ替わるというプロセスをとるが、極性充填剤のSFCでも同様と考えられる。それ故、極性充填剤を用いるSFCを一種の順相LCと見なすことができる。NH<sub>2</sub>シリカは、その表面の不均一性のため単純な吸着剤ではなく、またHammersによると、NH<sub>2</sub>シリカの吸着作用はdonor-acceptor複合体形成によって説明できると報告している<sup>49</sup>。しかし簡単のため、ここでは均一相の吸着剤として考え、吸着クロマトグラフィーの理論をSFCに適用した。Martireは格子モデルに基づき、吸着クロマトグラフィーにおける溶質保持の一般式を導いた<sup>32,33</sup>。吸着剤表面が、溶媒分子の単分子層で覆われていると仮定すると、SFCにおける溶質の保持は次のように表される。

$$\ln K = \ln K_b - \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \ln \theta_{b(m)} - \left(\frac{r_a z_c}{k_B T}\right) (1 - f_s)(1 - \theta_{b(m)})(\epsilon_{ab} - \epsilon_{bb}) \quad (3-16)$$

$$\ln K_b = \left(1 - \frac{r_a}{r_b}\right) \ln \left(\frac{z_m - 1}{z_s - 1}\right) + \left(\frac{r_a z_c f_s}{k_B T}\right) (\epsilon'_{bs} - \epsilon'_{as} + \epsilon_{ab} - \epsilon_{bb}) \quad (3-17)$$

$$\theta_{b(m)} = \frac{\rho R}{(1 + \sqrt{r_b})} \quad (3-18)$$

ここで $\theta_{b(m)}$ は移動相中で分子のhard coreが占める空間割合、 $z_m$ は3次元（移動相）での近接格子配位数、 $z_s$ は2次元（吸着剤表面）での近接格子配位数、 $z_c$ は分子セグ

メントの近接外部接触数、 $f_s$ は吸着剤表面と接触している分子の表面積割合、 $\epsilon'_{is}$ はタイプのセグメントと吸着剤サイトのあいだの相互作用の自由エネルギー、 $k_B$ はボルツマン定数、添字の a, b はそれぞれ溶質、溶媒を表す。もし式 3-16 の右辺第 3 項が無視できるならば、 $K$  の対数は密度の対数に対して直線的に減少する。実際に Fig. 3-6 に示されるように、 $\log k'$  は  $\log \rho$  に対して直線的に減少しており、本実験範囲では第 3 項は第 2 項に比べて無視できると考えられる。式 3-17 は溶媒と固定相との相互作用に関する項  $\epsilon'_{bs}$  を含んでいる。しかし式 3-7、3-8、3-9 の分配クロマトグラフィーの理論式では溶媒と固定相との相互作用は無視されている。吸着クロマトグラフィーでは、溶媒の溶解力 ( $\epsilon_{ab}$ ) だけでなく、吸着性 ( $\epsilon'_{bs}$ ) も重要であることが示されている。

Snyder は吸着クロマトグラフィーのモデルを提案した。吸着剤表面の活性サイトをめぐる溶質が溶媒分子と競合すると考え、次式を導出した<sup>3)</sup>。

$$\ln k' = \ln \phi \cdot \frac{(\Delta G_{as}^\circ - m\Delta G_{bs}^\circ)}{RT} \quad (3-19)$$

$$= \ln \phi \cdot \frac{(\Delta H_{as}^\circ - m\Delta H_{bs}^\circ)}{RT} + \frac{(\Delta S_{as}^\circ - m\Delta S_{bs}^\circ)}{R} \quad (3-20)$$

$$= \ln \phi + \ln V_a + a'(E^\circ - A_s \epsilon^\circ) \quad (3-21)$$

ここで  $m$  は一個の溶質分子が競合する溶媒分子の数、添え字の as, bs は溶質と吸着剤、溶媒と吸着剤の相互作用を表す。式 3-21 で  $a'$  は吸着剤の表面活性、 $E^\circ$  は溶質の吸着エネルギー、 $A_s$  は溶質のモル表面積、 $\epsilon^\circ$  は溶媒強度パラメーターである。

Snyder は液相のエネルギー項の溶媒-溶質、溶媒-溶媒間相互作用が無視できると仮定している。これは式 3-16、3-17 で  $\epsilon_{ab}$ 、 $\epsilon_{bb}$  が無視できるということの意味している。また、溶媒強度パラメーターは式 3-17 の相互作用自由エネルギー  $\epsilon'_{bs}$  に関係付けられる。

Fig. 3-8 に示されるように、移動相の種類が同じならば、式 3-11 は  $\text{NH}_2$  カラムでは成り立つ。しかし、式 3-11 右辺の  $\phi C_{st}^\circ \exp[(\mu_{ss}^\circ - \mu_{st}^\circ)/RT]$  は移動相の種類に依存することになる。これは  $\text{CO}_2$  と  $\text{N}_2\text{O}$  の固定相への吸着によって、 $\mu_{st}^\circ$  の値が両者で異なってくるためと考えられる。

式 3-16、3-17 は一定密度での  $\log k'$  vs.  $1/T$  プロットが直線になることを示している。 $\Delta H_1^{\text{app}}$  は相互作用エネルギー  $\epsilon_{ab}$ 、 $\epsilon_{bb}$ 、 $\epsilon'_{as}$ 、 $\epsilon'_{bs}$  のエンタルピー項と関係

づけられるが、Table 3-4に示されるように、各々のNH<sub>2</sub>カラムでの $\Delta H_1^{app}$ の値はN<sub>2</sub>OとCO<sub>2</sub>で似ている。C<sub>18</sub>充填剤では $\Delta H_1^{app}$ の値は移動相の種類によって異なっており、このNH<sub>2</sub>充填剤との違いは両者の保持機構の違いに基づいている。ただし、ここで展開された考察はNH<sub>2</sub>シリカを均相系として扱っている。通常のNH<sub>2</sub>充填剤ではアミノプロピル基がシリカ表面に結合しており、プロピル部分が疎水的効果を示すことが考えられる。また残留シラノール基がシリカ表面に残されているため、吸着作用はシラノール基とアミノ基の和になっていると考えられる。

### 3-3-6 極性充填剤、非極性充填剤における脂肪酸エステル分離

$\beta$ -カロテンの保持挙動を調べることで、SFCの保持メカニズムを論じたが、実際分離では分離される物質間の選択性が重要になる。前節までの考察で、C<sub>18</sub>充填剤を用いるSFC分離では溶質の移動相への溶解度が重要であり、NH<sub>2</sub>充填剤では溶質の固定相への吸着が重要となることが分かったが、選択性においても同様な傾向があるものと推測される。

そこで魚油由来の脂肪酸メチルエステルを対象物として、SFCによるC<sub>18</sub>充填剤、NH<sub>2</sub>充填剤における分離挙動をFig. 3-11に示した。移動相にはCO<sub>2</sub>を用いた。両方のカラムとも、不飽和度の同じ脂肪酸では炭素数の大きい方が強く保持される。しかし、二重結合数に対する選択性は逆になり、C<sub>18</sub>充填剤では二重結合数の小さいエステルほど強く保持され、NH<sub>2</sub>充填剤では二重結合数の大きいエステルほど強く保持される。不飽和度に対する選択性は固定相の性質に依存していることが分かる。

移動相にN<sub>2</sub>Oを用いた場合の分離例をFig. 3-12に示す。二章でも示したように、N<sub>2</sub>OはCO<sub>2</sub>よりも油脂に対する親和性が高い。溶解度が保持に支配的であるC<sub>18</sub>充填剤では、エステルの保持は小さくなりピーク間の分離は悪化している。一方、NH<sub>2</sub>充填剤ではピーク間の分離はC<sub>18</sub>充填剤ほど悪化しない。これは、Table 3-4に示されるように、CO<sub>2</sub>からN<sub>2</sub>Oに移動相を変えた時の保持の低下はC<sub>18</sub>充填剤で激しいことが、エステルの場合にも当てはまるためである。この差は、NH<sub>2</sub>充填剤では固定相への吸着が溶質の保持に重要であるという分離機構に帰着させられる。

第四章でNH<sub>2</sub>充填剤によるエステルの分離、第五章でC<sub>18</sub>充填剤によるエステルの分離について、詳しく記述する。

### 3-4 結言

極性、非極性充填剤における $\beta$ -カロテンのSFCでの保持挙動を調べ、逆相LC、順相LCで提案されている理論を用いてSFCの保持を解釈した。

- 1)  $\beta$ -カロテンの超臨界 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ への溶解度を測定した。同じ温度圧力では、 $\text{N}_2\text{O}$ が高い溶解力を示した。限られた密度範囲では、超臨界流体への溶質の溶解度の対数は密度の対数に対して直線的に変化するが、溶媒-溶質間相互作用だけが溶解度に関与するというChrastilのモデルが成り立つ場合に、成立する(式3-1)。
- 2)  $\text{C}_{18}$ 充填剤における $\beta$ -カロテンの保持は、移動相の溶質に対する溶解力にうまく相関できた。その関係は移動相の種類に依らず、移動相が $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ における保持比の対数は溶解度の対数に対して一本の直線となった。これは固定相の特性が移動相に影響されないという仮定が成立していることを示している(式3-11)。
- 3) 1)および2)が成り立つとき、保持比の対数は密度の対数に対して直線的に減少する。しかし、厳密な式によると、保持比の対数は密度の2次関数となる(式3-7、3-8、3-9)。その式では引力項と斥力項があり、引力項は密度に比例して保持比の対数を減少させ、斥力項は密度の2乗で保持比の対数を増大させる。従って高圧になると、保持は逆に上昇するようになることが予測される。
- 4) 移動相が保持におよぼす効果として引力項と斥力項があるが、これは逆相LCの場合にも対応する。引力項は溶媒-溶質分子間相互作用に基づき、斥力項は溶媒分子間相互作用に基づく。後者は、溶質の大きさの空間を移動相中につくるエネルギーに関係するが、極性の高い媒体が移動相として用いられる逆相LCでは、この移動相中に溶質サイズの空間を作るエネルギーが保持に重要となる(式3-5、3-6)。一方、SFCでは密度の増大に対して保持比が減少することから、溶媒-溶質間相互作用の方が重要と見なすことができる。
- 5) 一方、 $\text{NH}_2$ シリカを充填剤とするSFCの保持機構は $\text{C}_{18}$ 充填剤での保持機構とは根本的に異なっている。極性充填剤を用いたSFCにおける保持比と移動相の溶解度のプロットは、 $\text{CO}_2$ と $\text{N}_2\text{O}$ で異なる直線となり、 $\text{C}_{18}$ 充填剤の場合のように溶解度だけで整理することは出来なかった。
- 6) 極性充填剤のSFCは一種の順相LCと捉えることができる。保持のモデルとして、充填剤の吸着点をめぐる溶質と溶媒分子の競合を考えると、保持に重要となる移動相の特性は溶解力だけではなく、溶媒分子の充填剤への吸着性も大きな要因である(式3-17)。
- 7) 脂肪酸エステルの $\text{C}_{18}$ 充填剤、 $\text{NH}_2$ 充填剤におけるSFC分離挙動は異なっ

いた。両者の不飽和度に対する選択性は逆の傾向を示し、NH<sub>2</sub>充填剤ではエステルは二重結合数の順に溶出したが、C<sub>18</sub>充填剤ではその逆の順番で溶出した。移動相にN<sub>2</sub>Oを用いた場合、C<sub>18</sub>充填剤では保持の低下のためエステル間の分離は悪化した。NH<sub>2</sub>充填剤では保持低下の影響は小さかった。これは、極性充填剤では保持が吸着性に依存し、非極性充填剤では保持が溶媒の溶解力に依存しているためであると考えられる。



## REFERENCES

- 1) Chester, T. L., Pinkston, J. D., and Raynie, D. E., *Anal. Chem.*, **64**, 153R (1992).
- 2) Petersen, M., *J. Chromatogr.*, **505**, 3 (1990).
- 3) Snyder, L. R., "Principles of Adsorption Chromatography", Marcel Dekker, New York, chapter 8 (1968).
- 4) Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
- 5) Horvath, C., Melander, W., *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 393 (1977).
- 6) Berendsen, G. E., Galan, L. D., *J. Chromatogr.*, **196**, 21 (1980).
- 7) Colin, H., Guiochon, G., *J. Chromatogr.*, **158**, 183 (1978).
- 8) Kikta, E. J., Grushka, E., *Anal. Chem.*, **48**, 1098 (1976).
- 9) Hennion, M. C., Picard, C., Caude, M., *J. Chromatogr.*, **166**, 21 (1978).
- 10) Dorsey, J. G., Dill, K. A., *Chem. Rev.*, **89**, 331 (1989).
- 11) Dill, K. A., *J. Phys. Chem.*, **91**, 1980 (1987).
- 12) Tchaplal, A., Colin, H., Guiochon, G., *Anal. Chem.*, **56**, 621 (1984).
- 13) Sentell, K. B., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.*, **61**, 930 (1989).
- 14) Berger, T. A., Deye, J. F., *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 280 (1991).
- 15) Schoenmakers, P. J., Uunk, L. G. M., de Bokx, P. K., *J. Chromatogr.*, **459**, 201 (1988).
- 16) Ndiomu, D. P., Simpson, C. F., *J. Chromatogr.*, **505**, 161 (1990).
- 17) Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L. T., *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 331 (1988).
- 18) Bartle, K. D., Clifford, A. A., Jafar, S. A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **86**, 855 (1990).
- 19) Macaudiere, P., Caude, M., Rosset, R., Tambute, A., *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 583 (1989).
- 20) Sakaki, K., Yokochi, T., Suzuki, O., Hakuta, T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 553 (1990).
- 21) Brunner, G., Peter, S., *Sep. Sci Technol.*, **17**, 199 (1982).
- 22) Cygnarowicz, M. L., Maxwell, R. J., Seider, W. D., *Fluid Phase Equilib.*, **59**, 57 (1990).
- 23) Angus, S., Armstrong, B., de Reuck, K. M., "International Thermodynamic Tables of the Fluid State. Carbon Dioxide", Pergamon Press, Oxford, U. K., vol. III (1976).
- 24) Couch, E. J., Kobe, K. A., Hirth, L. J., *J. Chem. Eng. Data*, **6**, 229 (1961).
- 25) Chrastil, J., *J. Phys. Chem.*, **86**, 3016 (1982).

- 26) Roth, M., *J. Chromatogr.*, **543**, 262 (1991).
- 27) Allada, S. R., *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **23**, 344 (1984).
- 28) Lee, B. L., Kesler, M. G., *AIChE J.*, **21**, 510 (1975).
- 29) Barton, A. F. M., "CRC handbook of solubility parameters and other cohesion parameters", CRC Press, Boca Raton, Florida (1983).
- 30) Martire, D. E., Boehm, R. E., *J. Phys. Chem.*, **91**, 2433 (1987).
- 31) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1569 (1987).
- 32) Martire, D. E., *J. Chromatogr.*, **452**, 17 (1988).
- 33) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1779 (1988).
- 34) Czubryt, J. J., Myers, M. N., Giddings, J. C., *J. Phys. Chem.*, **74**, 4260 (1970).
- 35) Schneider, G. M., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **88**, 841 (1984).
- 36) Bartle, K. D., Clifford, A. A., Jafar, S. A., Kithinji, J. P., Shilstone, D. F., *J. Chromatogr.*, **517**, 459 (1990).
- 37) Bartle, K. D., Clifford, A. A., Jafar, S. A., *J. Chem. Eng. Data*, **35**, 355 (1990).
- 38) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., *J. Chromatogr.*, **448**, 87 (1988).
- 39) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., Fukushima, K., Nobuhara, K., *Anal. Sci.*, **5**, 335 (1989).
- 40) Taylor, L. T., Chang, H-C. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 357 (1990).
- 41) Lesellier, E., Tchaplal, A., Pechard, M.-R., Lee, C. R., Krstulovic, A. M., *J. Chromatogr.*, **557**, 59 (1991).
- 42) Ying, P. T., Dorsey, J. G., Dill, K. A., *Anal. Chem.*, **61**, 2540 (1989).
- 43) Sentell, K. B., Dorsey, J. G., *J. Chromatogr.*, **461**, 193 (1989).
- 44) Cole, L. A., Dorsey, J. D., *Anal. Chem.*, **64**, 1317 (1992).
- 45) Cole, L. A., Dorsey, L. G., Dill, K. D., *Anal. Chem.*, **64**, 1324 (1992).
- 46) Strubinger, J. R., Parcher, J. F., *Anal. Chem.*, **61**, 951 (1989).
- 47) Parcher, J. F., Strubinger, J. R., *J. Chromatogr.*, **479**, 251 (1989).
- 48) Strubinger, J. R., Song, H., Parcher, J. F., *Anal. Chem.*, **63**, 98 (1991).
- 49) Hammers, W. E., Spanjer, M. C., de Ligny, C. L., *J. Chromatogr.*, **174**, 291 (1979).

Table 3-1 Experimental solubility  $S$  of  $\beta$ -carotene in dense  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$ .

$T$ (K)	$P$ (MPa)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$S$	
			g/m <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup> y
$\text{CO}_2$				
308	9.95	700	0.18	0.022
	14.3	800	0.70	0.071
	19.8	862	1.4	0.13
	24.6	899	1.9	0.18
	29.4	928	2.4	0.22
313	9.87	616	0.085	0.011
	11.8	700	0.32	0.038
	14.8	770	0.82	0.087
	16.1	790	1.0	0.11
	16.8	800	1.2	0.12
	19.6	833	1.7	0.17
	24.7	878	2.7	0.25
	29.5	909	3.5	0.32
318	11.8	639	0.20	0.026
	13.5	700	0.49	0.058
	14.8	729	0.74	0.083
	19.2	800	1.8	0.18
	24.6	853	3.1	0.30
	29.8	889	4.4	0.40
323	12.2	590	0.15	0.021
	14.7	684	0.63	0.075
	15.4	700	0.80	0.094
	19.7	776	2.1	0.22
	21.7	800	2.7	0.28
	24.6	828	3.7	0.37
	29.5	867	5.3	0.50

T(K)	P(MPa)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	S	
			g/m <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup> y
N <sub>2</sub> O				
308	9.64	740	3.4	0.37
	13.6	800	9.5	0.97
	14.6	812	1.2 x 10	1.2
	19.7	856	2.1 x 10	2.0
	24.6	887	3.0 x 10	2.8
	29.4	910	3.9 x 10	3.5
313	10.1	700	3.1	0.36
	11.9	741	5.9	0.65
	15.3	791	1.2 x 10	1.3
	16.1	800	1.4 x 10	1.4
	19.6	834	2.2 x 10	2.2
	24.7	868	3.5 x 10	3.3
	29.5	893	4.7 x 10	4.3
318	9.88	620	1.6	0.21
	12.1	700	5.1	0.60
	14.8	754	1.1 x 10	1.2
	18.5	800	2.2 x 10	2.2
	19.6	810	2.5 x 10	2.6
	24.6	850	4.1 x 10	4.0
	29.5	876	5.8 x 10	5.4
323	11.9	647	3.1	0.39
	13.6	700	7.6	0.89
	15.1	726	9.9	1.1
	19.7	789	2.6 x 10	2.7
	20.9	800	3.0 x 10	3.1
	24.8	831	4.6 x 10	4.6
	29.5	860	6.6 x 10	6.3

Table 3-2 Solubility constants of  $\beta$ -carotene in  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$ .

gas	k	$\Delta H$ (J/mol)	$b^a$
$\text{CO}_2$	9.3	$7.2 \times 10^4$	-34.28
$\text{N}_2\text{O}$	10.9	$6.3 \times 10^4$	-45.93

$$a) b = q - \ln \left( \frac{[1000M_B]^k}{[M_A + kM_B]} \right).$$

Table 3-3 Melting point  $T_m$  and enthalpy of fusion  $\Delta H_{\text{fus}}$  of  $\beta$ -carotene.

state	$T_m$ (K)	$\Delta H_{\text{fus}}$ (J/mol)
crystalline	456	$5.6 \times 10^4$
amorphous	454	$4.1 \times 10^4$

Table 3-4 Values of  $k'$  and  $-\Delta H_1^{\text{app}}$  of  $\beta$ -carotene on various columns.

Column	$k'$ a)		$-\Delta H_1^{\text{app}}$ (kJ/mol) <sup>b)</sup>	
	mobile phase		mobile phase	
	$\text{CO}_2$	$\text{N}_2\text{O}$	$\text{CO}_2$	$\text{N}_2\text{O}$
Inertsil ODS	55.6	5.75	37.2	24.7
Cosmosil C18-AR	21.6	1.99	42.5	26.1
W2-100	92.1	8.18	38.7	27.6
Cosmisil $\text{NH}_2$	13.5	5.92	26.7	25.3
Super $\text{NH}_2$	27.1	17.3	27.4	29.8

a) Temperature; 313 K, mobile phase density; 800  $\text{kg/m}^3$ .

b) Mobile phase density; 800  $\text{kg/m}^3$ .

Table 3-5 Values of intercept and slope of the  $\ln k'$  vs.  $\ln S$  plot.

Column	intercept, a <sup>a)</sup>		slope, b <sup>a)</sup>	
	mobile phase		mobile phase	
	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O
Inertsil ODS	4.30	4.21	0.94	0.87
Cosmosil C18-AR	3.34	3.15	0.94	0.89
W2-100	4.81	4.85	1.01	0.96
Cosmosil NH <sub>2</sub>	2.70	4.32	0.95	0.92
Super NH <sub>2</sub>	3.44	5.61	1.10	1.06

a)  $\ln k' = a - b \ln S$  (g/m<sup>3</sup>). Temperature; 313 K.

Table 3-6 Values of  $\Delta H_{st}^\circ$  of  $\beta$ -carotene on various C<sub>18</sub>-columns.

Column	$\Delta H_{st}^\circ$ (kJ/mol)	
	mobile phase	
	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O
Inertsil ODS	34.8	38.3
Cosmosil C18-AR	29.5	35.4
W2-100	33.3	37.4

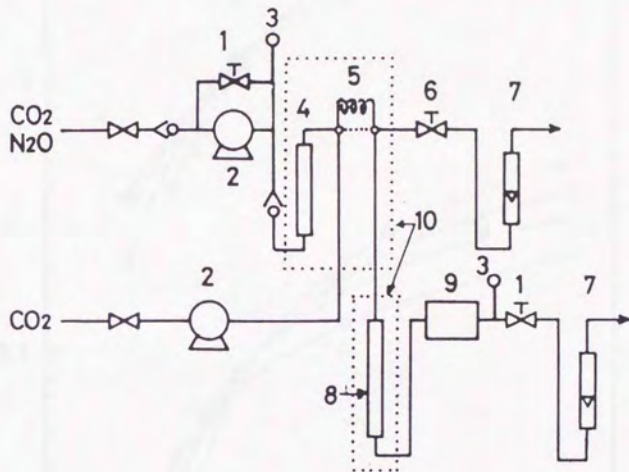


Fig. 3-1 Schematic diagram of the apparatus: (1) back-pressure regulator: (2) pump: (3) pressure gauge: (4) extraction cell: (5) sample loop: (6) metering valve: (7) flow-meter: (8) packed column: (9) UV/vis detector: (10) column oven.

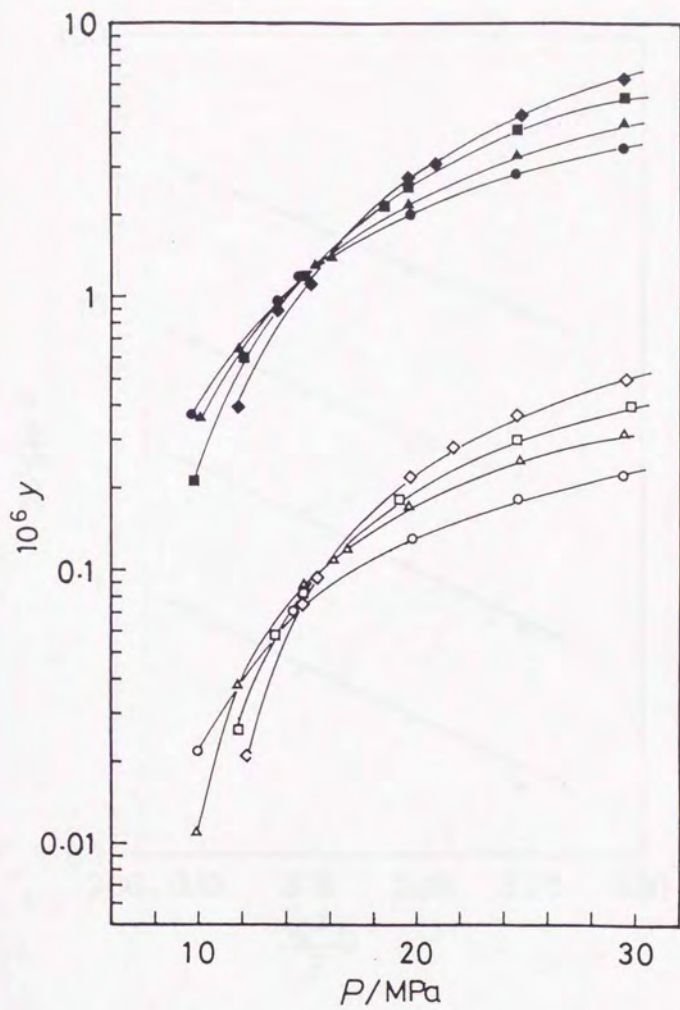


Fig. 3-2 Solubility of  $\beta$ -carotene in  $CO_2$  and  $N_2O$ .  $CO_2$ :  $\circ$ , 308 K;  $\triangle$ , 313 K;  $\square$ , 318 K;  $\diamond$ , 323 K.  $N_2O$ :  $\bullet$ , 308 K;  $\blacktriangle$ , 313K;  $\blacksquare$ , 318 K;  $\blacklozenge$ , 323 K.



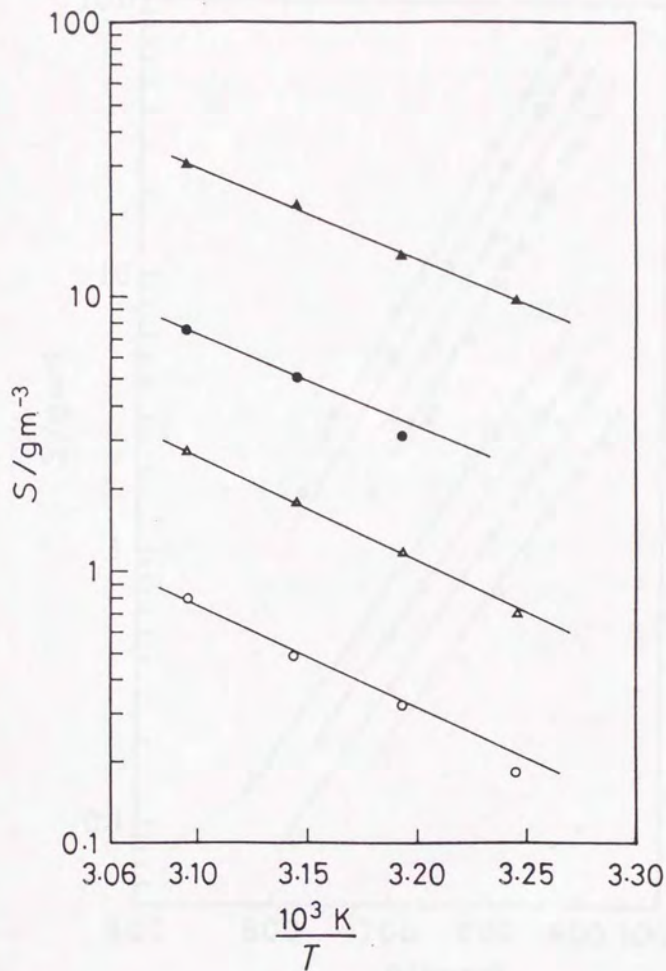


Fig. 3-3 Solubility  $S$  versus reciprocal temperature at various gas densities.  
 CO<sub>2</sub>: ○, 700 kg/m<sup>3</sup>; △, 800 kg/m<sup>3</sup>. N<sub>2</sub>O: ●, 700 kg/m<sup>3</sup>; ▲, 800 kg/m<sup>3</sup>.

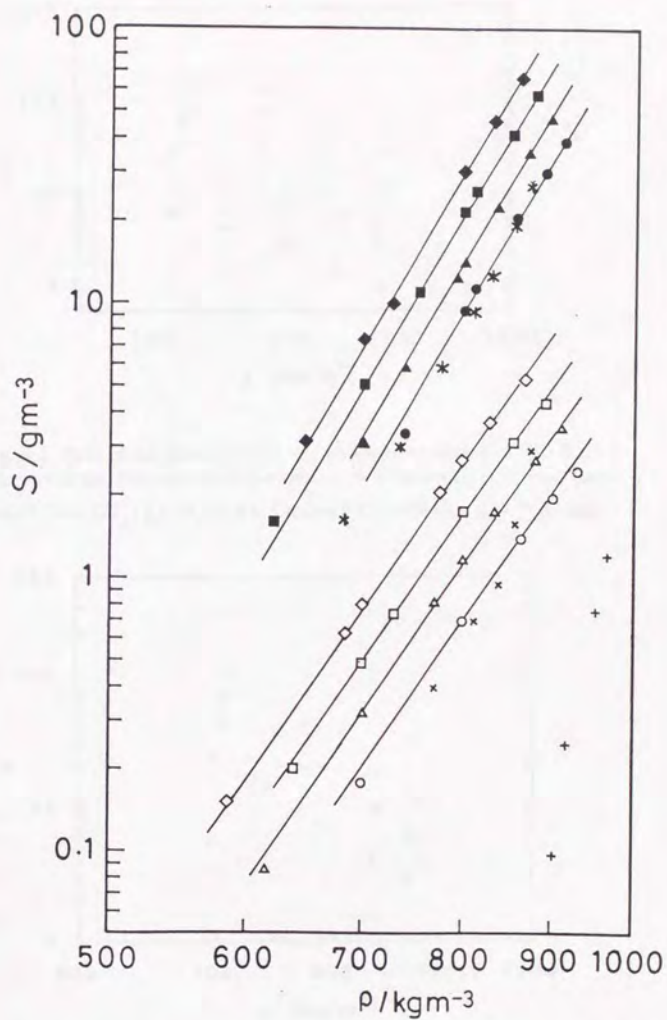


Fig. 3-4 Solubility  $S$  of  $\beta$ -carotene in  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$ . Present work,  $\text{CO}_2$ :  $\circ$ , 308 K;  $\triangle$ , 313 K;  $\square$ , 318 K;  $\diamond$ , 323 K.  $\text{N}_2\text{O}$ :  $\bullet$ , 308 K;  $\blacktriangle$ , 313K;  $\blacksquare$ , 318 K;  $\blacklozenge$ , 323 K. Cygnarowicz et al. (22),  $\text{CO}_2$ :  $+$ , 313 K;  $\times$ , 333 K;  $*$ , 343 K. The curves calculated from eqs 3-2, 3-3.

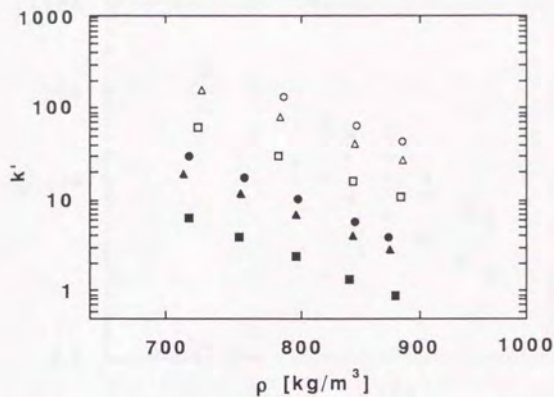


Fig. 3-5 Plots of the capacity factor vs. mobile phase density at 313 K on ODS-columns. Column and mobile phase: W2-100P CO<sub>2</sub> (○), N<sub>2</sub>O (●); Inertsil ODS CO<sub>2</sub> (△), N<sub>2</sub>O (▲); Cosmosil C18-AR CO<sub>2</sub> (□), N<sub>2</sub>O (■).

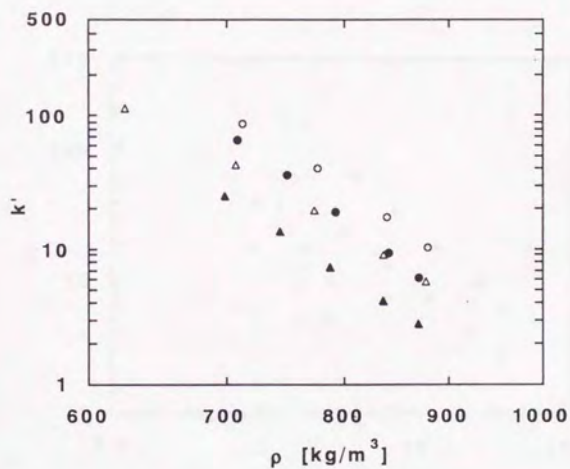


Fig. 3-6 Plots of the capacity factor vs. mobile phase density at 313 K on NH<sub>2</sub>-columns. Column and mobile phase: Super NH<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> (○), N<sub>2</sub>O (●); Cosmosil NH<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> (△), N<sub>2</sub>O (▲).

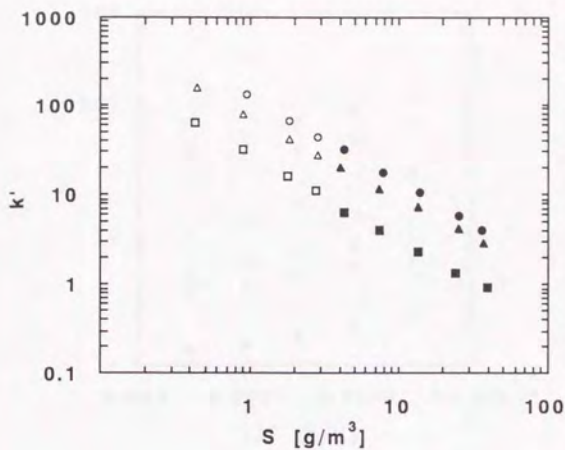


Fig. 3-7 Plots of the capacity factor vs. solute solubility at 313 K on ODS-columns. Column and mobile phase: W2-100P  $\text{CO}_2$  ( $\circ$ ),  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\bullet$ ); Inertsil  $\text{CO}_2$  ( $\triangle$ ),  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\blacktriangle$ ); Cosmosil C18-AR  $\text{CO}_2$  ( $\square$ ),  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\blacksquare$ ).

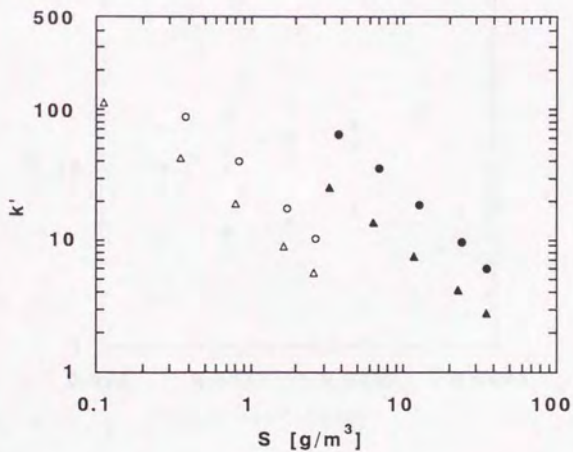


Fig. 3-8 Plots of the capacity factor vs. solute solubility at 313 K on  $\text{NH}_2$ -columns. Column and mobile phase: Super  $\text{NH}_2$   $\text{CO}_2$  ( $\circ$ ),  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\bullet$ ); Cosmosil  $\text{NH}_2$   $\text{CO}_2$  ( $\triangle$ ),  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\blacktriangle$ ).

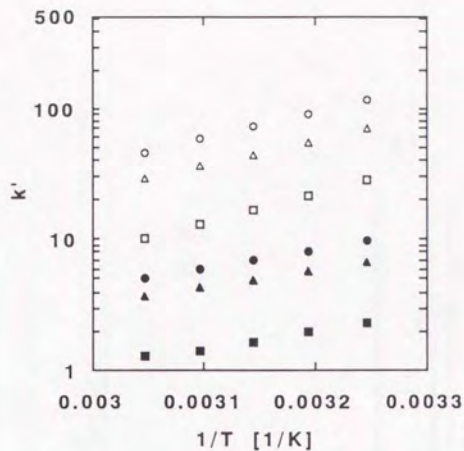


Fig. 3-9 van't Hoff plots of  $\beta$ -carotene on ODS-columns at a constant density. Mobile phase density:  $800 \text{ kg/m}^3$ . Column and mobile phase: W2-100P  $\text{CO}_2$  (○),  $\text{N}_2\text{O}$  (●); Inertsil ODS  $\text{CO}_2$  (△),  $\text{N}_2\text{O}$  (▲); Cosmosil C18-AR  $\text{CO}_2$  (□),  $\text{N}_2\text{O}$  (■).

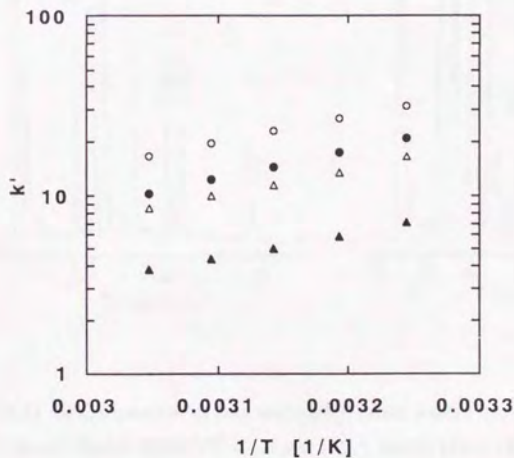


Fig. 3-10 van't Hoff plots of  $\beta$ -carotene on  $\text{NH}_2$ -columns at a constant density. Mobile phase density:  $800 \text{ kg/m}^3$ . Column and mobile phase: Super  $\text{NH}_2$   $\text{CO}_2$  (○),  $\text{N}_2\text{O}$  (●); Cosmosil  $\text{NH}_2$   $\text{CO}_2$  (△),  $\text{N}_2\text{O}$  (▲).

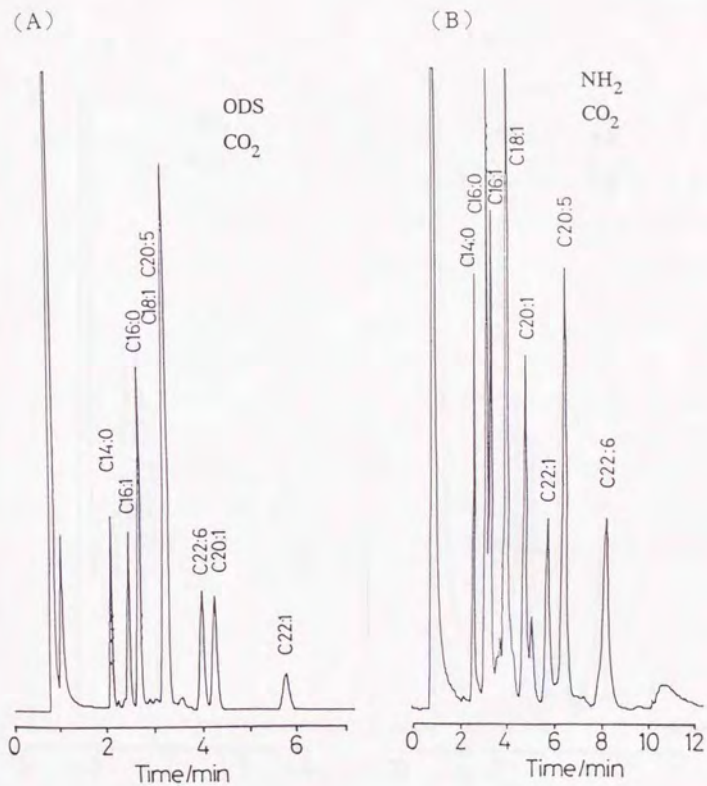


Fig. 3-11 SFC separation of fatty acid methyl esters derived from fish oil.

(A) Column Inertsil ODS (150 x 4.6 mm I. D.), mobile phase CO<sub>2</sub> (10 MPa, 313 K), flow rate 2.4 g/min, detector FID. (B) Column Cosmosil NH<sub>2</sub> (150 x 4.6 mm I. D.), mobile phase CO<sub>2</sub> (10 MPa, 313 K), flow rate 2.5 g/min, detector FID.

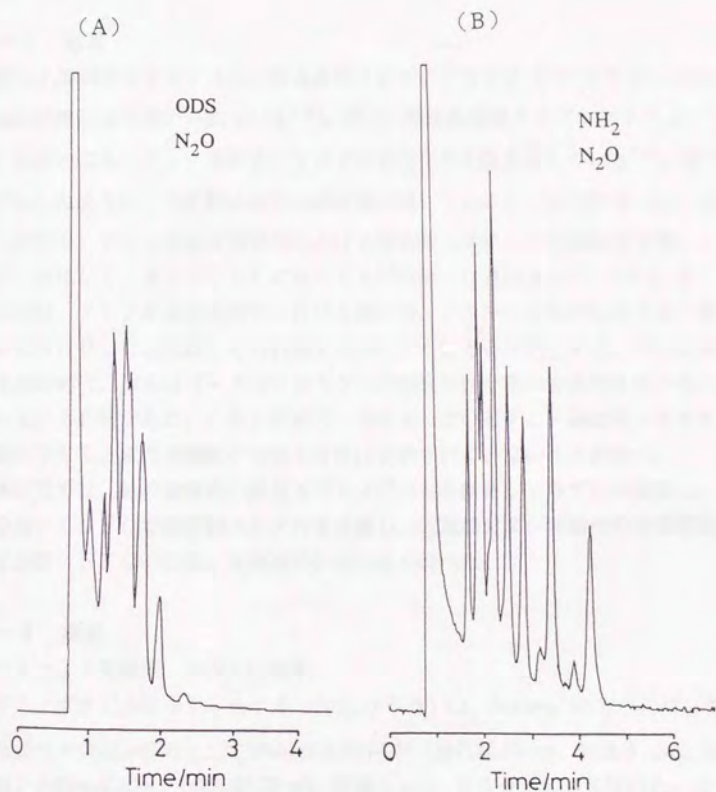


Fig. 3-12 SFC separation of fatty acid methyl esters derived from fish oil.

(A) Column Inertsil ODS (150 x 4.6 mm I. D.), mobile phase N<sub>2</sub>O (9.0 MPa, 313 K),

flow rate 2.5 g/min, detector FID. (B) Column Cosmosil NH<sub>2</sub> (150 x 4.6 mm I. D.),

mobile phase CO<sub>2</sub> (8.9 MPa, 313 K), flow rate 2.6 g/min, detector FID.

## 第四章

### アミノ基結合シリカゲルを充填剤とするSFCによる脂肪酸エステルの分離

#### 4-1 緒言

アミノ基結合シリカゲルは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）における糖類の分離によく用いられている<sup>1-3</sup>。また、超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）においても、アミノ基結合シリカゲルの応用例が報告されている<sup>4,5</sup>。また第三章で示したように、脂肪酸エステルの分離に適していることが報告されている<sup>6</sup>。しかしながら、アミノ基結合充填剤における脂肪酸エステルの分離挙動を詳しく調べられた例はなく、またHPLCにおいても脂肪酸には適用されていない。そこで本研究では、アミノ基結合充填剤における脂肪酸エステルの分離挙動を詳細に調べ、SFCのHPLCと比較しての特徴を明確にすることを目的とする。そのためには、充填剤の特性、例えばベースのシリカゲルの種類や結合基の表面密度等が明らかになっている必要がある。しかしながら、市販されているアミノ基結合シリカゲルの種類は少なく、また充填剤の物性や特性は公表されていないことが多い。

本研究では、結合基密度の異なるアミノプロピル結合シリカゲルを調製し、それらを用いてSFCで脂肪酸エステルを分離し、固定相および移動相の分離挙動に及ぼす影響、SFCの特徴、充填剤の評価方法を調べた。

#### 4-2 実験

##### 4-2-1 充填剤、カラムの調製

アミノプロピル結合シリカゲル（NH<sub>2</sub>シリカ）は、Jonesら<sup>7</sup>の方法に従って合成した。ベースのシリカとしてWakosil II-5sil-100（細孔径10 nm、粒径5 μm、和光純薬製）とFinesil 100-5（細孔径10 nm、粒径5 μm、日本分光製）を用いた。まずシリカゲルを393 Kで4時間以上真空乾燥し、その3 gを200 mLフラスコに移し、そこに所定の3-アミノプロピルトリエトキシシランを含むヘキサンを50 mL加え、30分間還流した。反応後、ガラスフィルターで濾過し、ヘキサン、アセトン、メタノールで洗浄し373 Kで24時間以上真空乾燥した。ゲルの炭素および窒素含量を元素分析で測定した。

ゲルはスラリー法により、内径4.6 mm、長さ150 mmのカラムに充填した。1.5 gのゲルを20 mLの水に懸濁し、35 MPaの圧力で充填した。カラム内はアセトン、ヘキサンの置換した後、超臨界二酸化炭素で完全にパージした。



#### 4-2-2 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には以前報告した装置 (Fig. 1-3参照)を使用した<sup>8)</sup>。また、調製したカラムの他に、市販のカラム、Cosmosil NH<sub>2</sub> (粒径10 μm、内径4.6mm、長さ150 mm、半井化学製)、Wakosil NH<sub>2</sub> (粒径5 μm、内径4.6mm、長さ150 mm、和光純薬製)、Super NH<sub>2</sub> (粒径10 μm、内径4.6mm、長さ150 mm、日本分光製)を用いた。試料として、ミリスチン酸 (C<sub>14:0</sub>)、パルミチン酸 (C<sub>16:0</sub>)、ステアリン酸 (C<sub>18:0</sub>)、オレイン酸 (C<sub>18:1</sub>)、リノール酸 (C<sub>18:2</sub>)、 $\alpha$ -リノレン酸 (C<sub>18:3</sub>) のメチルエステル、および魚油由来の脂肪酸メチルエステルを用いた。エステルの検出にはUV検出器を用い、200 nmでの吸収を測定した。移動相として、CO<sub>2</sub>を用い、圧力10-20 MPa、温度313 K、流速1.2 g/minで分離を行った。

#### 4-2-3 液体クロマトグラフィー

調製したNH<sub>2</sub>シリカのキャラクタリゼーションのため、HPLCにおけるグルコース、フルクトースの分離挙動を調べた。溶離液にアセトニトリル/水(4:1)を用いた。温度303 K、流速1.0 mL/minで検出器にRIを用いた。

また、SFCとの比較のため、HPLCモードでのシリカゲルとNH<sub>2</sub>シリカにおける脂肪酸エステルの分離挙動を調べた。溶離液として、ベンゼン-ヘキサン、アセトン-ヘキサン、エタノール-ヘキサンの二成分系を用いた。温度303 K、流速1.0 mL/minで検出器にRIを用いた。

### 4-3 結果と考察

#### 4-3-1 調製アミノ基結合シリカの特徴

調製したゲルの炭素、窒素含量をTable 4-1に示した。Wakosil IIは元々炭素を含んでいるが、これはシリカゲルを合成する際に添加される界面活性剤に由来すると思われる。そのため調製したゲルのアミノプロピル基結合密度はその窒素含量から計算した。アミノプロピル基結合密度と仕込シラン濃度の関係をFig. 4-1に示す。結合密度は仕込シラン濃度の増大につれ大きくなるが、シラン:シリカ比が20 wt%以上で飽和し、最大で約1 mmol/gの値をとる。Jonesらは、アミノプロピル基結合量を燃焼による重量の減少から計算した<sup>7)</sup>。彼らの結果では、結合量はシラン:シリカ比の増大とともに、飽和には達することなく増大した。彼らはまた、調製した充填剤に

おける糖類の液体クロマトグラフィーでの挙動を調べ、8.5 wt%以上の結合量では糖類の保持比が一定になることから、シランモノマーのポリマー化が生じていると結論した。本実験での彼らと異なる結果を説明するため、調製した $\text{NH}_2$ シリカを用いグルコースとフラクトースのLCにおける溶出挙動を調べた。それらの保持比と結合密度の関係をFig. 4-2に示す。糖類の保持比は、結合密度と共に増大し、保持の一定化は観測されなかった。Figs. 4-1, 4-2から考察すると、本実験ではシラン：シリカ比が20 wt%以上では、シランモノマーは反応に関与しておらず、Jonesが報告したようなポリマー化はほとんど生じていないと思われる。ポリマー化は微量の水の存在下で生じるが、本実験では、溶媒、シリカゲルを十分乾燥したためこのポリマー化が避けられたものと考えられる。

Wakosil IIの表面積は $350 \text{ m}^2/\text{g}$ であり、換算すると面積当りの最大結合量は、約 $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ になる。シリカゲル表面の平均シラノール基密度は約 $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ と言われており<sup>9,10</sup>、1分子の3反応基シランは1～2個のシラノール基と反応することから<sup>11</sup>、最大結合密度のゲルにおいても、未反応のシラノール基が残されている。従って、調製したゲルの特性は、シラノール基とアミノプロピル基の合わさったものになる。

#### 4-3-2 脂肪酸メチルエステルの分離挙動

SFCにおける脂肪酸エステルの保持比と仕込シラン量の関係をFig. 4-3に示した。試料にパルミチン酸メチル、リノール酸メチルを用い、温度313 K、圧力15 MPaで測定した。未結合シリカを除いたゲルにおいて、保持比は仕込シラン濃度の増大とともに減少するが、シラン濃度約30 wt%以上で、保持は一定になる。同じ保持比のデータを結合密度の関数としてFig. 4-4に示した。保持比は結合密度とともに減少するが、高い結合密度の範囲では、保持比のばらつきが大きい。このばらつきは固定相の状態の違い、例えば一分子の三官能基シランと結合するシリカ表面の水酸基数(1 or 2)、少量の水の存在で引き起こされる制御できないシランのポリマー化の発生が原因となっていると考えられる。LCによる糖類の分離では、高結合密度でこのような大きなばらつきは観測されなかった。このSFCとLCの違いとして、SFCのクロマト挙動がLCの場合よりも固定相の特性に敏感であることが考えられる<sup>5,12-16</sup>。また、HPLCによる糖類の分離では、その保持は結合基密度の増大とともに大きくなるが、脂肪酸エステルのSFC分離では減少する。このことから、糖類の保持はアミノプロピル結合基との相互作用によると考えられるが、SFCでの脂肪酸エステルの保持は結合基だけでなく残留シラノール基との相互作用も関与していると思われる。

第五章で論じるが、 $C_{18}$ シリカでのエステルの保持挙動をSFCで調べた<sup>16,17)</sup>。十分に充填剤表面が不活性化されたゲルでは、 $C_{18}$ 充填剤でのエステルの保持は同じ温度圧力におけるシリカ充填剤での保持よりもずっと小さい。例えば、 $C_{18}$ シリカSFCにおけるパルミチン酸メチルの保持比は313 K、15 MPaで1よりも小さい (Fig. 5-1, 5-7)。一方Fig. 4-3に示されるように、同一条件でシリカゲルのWakosil IIでは保持比は約8となる。このことは、充填剤の吸着力がエステルの保持に寄与していることを示している。アミノプロピル基はシリカ表面のシラノール基よりも極性が小さいため、結合密度の増大によって充填剤の吸着性は低下し、こうして保持比が低下したと考えられる。

第三章で示したように、 $NH_2$ 充填剤において、鎖長が長く不飽和度の大きいエステルほど保持が大きくなる。エステルの保持比と鎖長、不飽和度の関係をFigs. 4-5, 4-6に示した。Fig. 4-5では、飽和脂肪酸のミスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸のメチルエステルを、Fig. 4-6では、炭素数18で二重結合数の異なるステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸のメチルエステルを試料に用いた。保持比の対数は炭素数、二重結合数に対して直線になる。これはMartireのSFC保持を表す式によって説明できる (式3-16、3-17、3-18の再掲)<sup>17,18)</sup>。

$$\ln K = \ln K_b - \left(\frac{r_a}{r_b}\right) \ln \theta_{b(m)} - \left(\frac{r_a z_s^2 \epsilon}{k_B T}\right) (1 - f_s)(1 - \theta_{b(m)})(\epsilon_{ab} - \epsilon_{bb}) \quad (4-1)$$

$$\ln K_b = \left(1 - \frac{r_a}{r_b}\right) \ln \left(\frac{z_m - 1}{z_s - 1}\right) + \left(\frac{r_a z_s^2 \epsilon}{k_B T}\right) (\epsilon'_{bs} - \epsilon'_{as} + \epsilon_{ab} - \epsilon_{bb}) \quad (4-2)$$

$$\theta_{b(m)} = \frac{\rho R}{(1 + \sqrt{r_b})} \quad (4-3)$$

ここで $\theta_{b(m)}$ は移動相中で分子のhard coreが占める空間割合、 $z_m$ は3次元 (移動相) での近接格子配位数、 $z_s$ は2次元 (吸着剤表面) での近接格子配位数、 $z_e$ は分子セグメントの近接外部接触数、 $f_s$ は吸着剤表面と接触している分子の表面積割合、 $\epsilon'_{is}$ はタイプ*i*のセグメントと吸着剤サイトのあいだの相互作用の自由エネルギー、 $k_B$ はボルツマン定数、添字の*a*, *b*はそれぞれ溶質、溶媒を表す。同族体のメチレン基に対する選択性の場合、溶質のセグメントと移動相および固定相との相互作用は同じなので ( $\epsilon_{ab}$ ,  $\epsilon'_{as}$ が不変)、同じ温度、密度ならば、 $\ln K$ は $r_a$ に比例する。 $r_a$ は分子サイズを表すので、保持比の対数は炭素数に対して直線的になる。 $NH_2$ シリカは均相系ではなく、また非極性のプロピル基を含んでいるため、吸着のモデルが当てはまるとは限らない。しかし、分配のモデルが成立している場合でも、一定密度、温

度では、式3-7、3-8、3-9に示されるように $\ln K$ は $r_a$ に比例しており、同様に理解することができる。

炭素数が一定で二重結合が異なる場合は、その保持はより複雑である。不飽和度によって分子のvan der Waals 体積が変化するため、 $r_a$ は変化する。Bondiiによると(-CH<sub>2</sub>-)の体積は10.23 cm<sup>3</sup>/molで、(=CH-)の体積は8.47 cm<sup>3</sup>/molである<sup>19)</sup>。しかし、 $r_a$ の減少は保持の減少を導くにもかかわらず、実際は二重結合は保持を増大させるように作用する。これは、固定相との吸着作用(式4-2の $\epsilon'_{as}$ )が保持に効いてくるためである。保持比の対数が二重結合数に比例することから、分子の吸着エネルギーは二重結合数におおよそ比例して増大すると考えられる。また、溶質と移動相分子との相互作用項の $\epsilon_{ab}$ であるが、CO<sub>2</sub>が非極性分子であるため、二重結合数の増加による変化は小さいものと考えられる。

このように、脂肪酸の溶出挙動は、鎖長と二重結合数に依存することが分かる。そこでエステル間の選択性を二つに分解して捉えることができる。一つは炭素数に対する選択性で $\alpha_{CN}$ で表し、他方は二重結合数に対する選択性で $\alpha_{DB}$ で表す。ここでは、 $\alpha_{CN}$ と $\alpha_{DB}$ をつぎのように定義する。

$$\alpha_{CN} = k(C_{16:0})/k(C_{14:0})$$

$$\alpha_{DB} = k(C_{18:1})/k(C_{18:0})$$

Fig. 4-7に313 K, 15 MPaにおける二つの選択性と充填剤の結合基密度の関係を示した。未結合シリカゲルを除いて、 $\alpha_{CN}$ は結合基密度の上昇とともに増大するが、 $\alpha_{DB}$ は減少する。上述したように、不飽和度に対する選択性が充填剤の吸着性に関係しているが、 $\alpha_{DB}$ の減少は結合密度の増大による充填剤の吸着性の減少のためであると考えられる。結合密度の増大による $\alpha_{CN}$ の上昇は、シリカ表面の炭化水素鎖の増大によるものと考えられる。この推定は、長い炭化水素鎖を持つC<sub>18</sub>充填剤においてより大きい $\alpha_{CN}$ が得られているという事実によって支持される。例えば、市販のC<sub>18</sub>カラムでは313 K, 15 MPaで $\alpha_{CN}$ は約1.4の値をとるが<sup>16,20)</sup>、本実験では1.13以下の値であった。

#### 4-3-3 脂肪酸エステルの選択性におよぼす移動相密度の影響

Fig. 4-8に $\alpha_{CN}$ と $\alpha_{DB}$ の移動相密度依存性を示す。カラムにWakosil II, WN1, WN4を用いた。 $\alpha_{CN}$ は密度の増大とともに減少するが、 $\alpha_{DB}$ は密度にほとんど依存しない。

式4-1から考察すると、二重結合数の違いによるセグメント数 $r_a$ と相互作用エネルギー $\epsilon_{ab}$ の差が小さいと言え、 $\alpha_{DB}$ は主に固定相に依存している。これは前節で考察した通りである。

また、炭素数に対する選択性は、吸着クロマトグラフィーを考えると、鎖長に対する選択性は次式のように表される。

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial r_a}\right) = \frac{-1}{r_b} \ln \left(\frac{z_m - 1}{z_s - 1}\right) + \left(\frac{z_m f_s}{k_B T}\right) (\epsilon'_{bs} - \epsilon'_{as} + \epsilon_{ab} - \epsilon_{bb}) - \frac{1}{r_b} \ln \theta_{b(m)} - \left(\frac{z_e}{k_B T}\right) (1 - f_s)(1 - \theta_{b(m)})(\epsilon_{ab} - \epsilon_{bb}) \quad (4-4)$$

上式で第4項が無視できるならば、炭素数に対する選択性は密度の増大によって減少することが分かる。 $\ln K$ は $r_a$ の一次関数になっているので、 $(\partial \ln K / \partial r_a)$ の密度依存性は $\ln K$ の密度依存性と類似している。なお、メチレン基と $\text{CO}_2$ における相互作用自由エネルギーはMartireによって $(\epsilon_{ab}/\epsilon_{bb}) = 0.88$ と与えられている<sup>21)</sup>。また、選択性がプロピル基への分配に依るものならば、式3-7、3-8、3-9が当てはまり、 $\ln K$ を $r_a$ で偏微分したものは、吸着の場合と同様に密度の関数となっている。

#### 4-3-4 液体移動相による脂肪酸エステル分離

Wakosil IIとWN4を取り上げ、脂肪酸エステルのHPLCにおける分離挙動を調べた。用いた溶媒はベンゼン-ヘキサン系、アセトン-ヘキサン系、エタノール-ヘキサン系であり、その組成および溶媒強度パラメーターをTable 4-2に示した。温度303 Kで行ったが、その時のステアリン酸メチルの保持比および前節で定義した選択性 $\alpha_{CN}$ 、 $\alpha_{DB}$ をTable 4-2に合わせて示した。 $\epsilon^{\circ}$ は、Snyderが導入した溶媒の固定相への吸着性の強さを表すパラメーターで、溶出力の指標である(式3-21参照)<sup>22)</sup>。混合溶媒の溶媒強度パラメーターは次式を用いて計算できる。

$$\epsilon^{\circ}_{WS} = \epsilon^{\circ}_W + \frac{\log [X_S 10^2 n_S (\epsilon^{\circ}_S - \epsilon^{\circ}_W) + 1 - X_S]}{a' n_S} \quad (4-5)$$

添字のWは弱溶媒、Sは強溶媒を表す。 $X_S$ は溶媒中の強溶媒のモル分率、 $a'$ は吸着剤の活性度、 $n_S$ は分子サイズを表す。シリカゲル基準の溶媒強度パラメーターは、アルミナ基準での値に0.77を掛けた値になる。純粋なヘキサン、ベンゼン、アセトン、エタノールのアルミナ基準での溶媒強度パラメーターは、それぞれ0.01、0.32、0.56、0.88である。アルミナの活性度は0.6、シリカゲルは0.7である。

式3-21によると、保持比の対数は溶媒強度パラメーターに比例する。そこで、Fig. 4-9にステアリン酸メチルの対数と溶媒強度パラメーターの関係を示す。加える強溶媒の種類によって異なる直線となり、 $\epsilon^\circ$ で統一的に整理することは出来なかった。特に、アセトンで得られた結果は他の結果と大きく違っている。この理由として、式4-5で用いたパラメーターが適当でなかったことが考えられる。アセトンの分子サイズとして $n_S = 4.2 (\times 8.5 \text{ \AA}^2)$ を用いたが、充填剤表面における配向によって、吸着剤表面上で占める面積が変化することが考えられる。LCにおいて $\epsilon^\circ$ は溶媒を選択する場合に有効なパラメーターであるが、混合溶液系では無極性の媒体に極性の高い溶媒が微量でも添加されると値が大きく変化し、またそれとともに溶質の保持も大きく変化するため、溶離液組成の決定が難しくなる。

また、LCではどのカラムでも、飽和脂肪酸のミスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸間の分離はできなかった。ヘキサンを移動相とする吸着クロマトグラフィーでは、サイズによる分離は難しいことが分かる。SFCでも、圧力の増大によって $\alpha_{CN}$ が低下することから、炭素数に対する選択性は移動相の溶解力に依存していると考えられる。

Table 4-2から、保持比と $\alpha_{DB}$ の間に相関があると考えられる。これは式3-21から保持比の対数は $\epsilon^\circ$ に対して直線関係があり、また選択性は

$$\ln \alpha = a'(F_2 - F_1) - a'(A_{S2} - A_{S1})\epsilon^\circ \quad (4-6)$$

なので、溶質のサイズの差がある場合、選択性の対数は $\epsilon^\circ$ に対して直線関係がある。そこで、Fig. 4-10に $\ln \alpha_{DB}$ と $\ln k'_{C18:0}$ の関係を示した。また、 $CO_2$ を移動相とした時のデータも合わせて示した。液体溶媒では、 $\alpha_{DB}$ は $k'_{C18:0}$ の減少とともに小さくなる。これは式4-6から予測される。しかし、SFCでは $k'_{C18:0}$ の変化に対する $\alpha_{DB}$ の変化は小さい。この違いは次のように捉えることが出来る。同一媒体のSFCでは、保持比の減少は移動相密度の増大によるものである(式4-1)。一方、 $\alpha_{DB}$ は主に二つの溶質の固定相への吸着力の差、即ち式4-2の $K_b$ の差がサイズの差( $r_s$ の違い)よりも重要となる。 $K_b$ は密度には依存しないため、 $\alpha_{DB}$ は密度に対し保持比ほど影響されない。

このように、溶媒のSFCは移動相の特性を変えずに保持比を大きく変えることが出来るという特徴がある。順相液体クロマトグラフィーでは、望ましい保持時間内に分離を達成し十分な選択性を得るような溶媒の選定が難しいと言われている。SFCでは、圧力を変えることで、選択性をあまり変えることなく保持時間を変えることが容易に行えるという利点を持っている。

#### 4-3-5 充填剤のキャラクタリゼーション

調製および市販のカラムを用いて、魚油由来の脂肪酸エステルを分離を行った。その主な脂肪酸組成は、 $C_{14:0} = 5 \text{ wt\%}$ ,  $C_{16:0} = 13 \text{ wt\%}$ ,  $C_{16:1} = 7 \text{ wt\%}$ ,  $C_{18:1} = 13 \text{ wt\%}$ ,  $C_{18:4} = 3 \text{ wt\%}$ ,  $C_{20:1} = 9 \text{ wt\%}$ ,  $C_{20:5} = 15 \text{ wt\%}$ ,  $C_{22:1} = 8 \text{ wt\%}$ ,  $C_{22:6} = 10 \text{ wt\%}$ , その他17 wt%(キャピラリーGC、FIDによる)である。その例をFig. 4-11に示した。温度は313 Kで行い、圧力はWakosil IIとWN2が20 MPa、WN4、WN6、FN1およびSuper  $\text{NH}_2$ が15 MPa、Wakosil  $\text{NH}_2$ が12 MPa、Cosmosil  $\text{NH}_2$ が10 MPaである。SFCでは圧力を大きくすると試料の溶出は速くなるが、Fig. 4-11に示した実験では、分離時間がほぼ同じになるよう圧力を調整した。Wakosil IIでは、脂肪酸エステルはその二重結合数の違いによって分離される。アミノプロピル基結合量の大きい充填剤では、さらに多くのピークに分離されている。これは、炭素数に対する選択性が増大したことに由来する。例えば、二重結合数1の $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{20:1}$ 、 $C_{22:1}$ が分離されるようになったためと考えられる。また比較のため、移動相に液体を用いて行った分離例をFig. 4-12に示す。前節で示したように、炭素数に対する選択性が見られないため、エステル間の分離は不十分であり、ピークは二重結合数が0と1の部分と5と6の部分に分離されるだけである。

Fig. 4-11に示されるように、分離挙動の違いが、市販の充填剤の間においても観察される。この違いは、アミノ基の結合密度だけでなく、ポリマー化等の結合の状況やベースシリカの特性にも由来すると考えられる。様々なアミノプロピル基結合シリカゲルのキャラクタリゼーションのため、SFCにおける脂肪酸エステルの保持と選択性を用いることを試みた。Fig. 4-13に各々の充填剤のオレイン酸メチルとパルミチン酸メチルの保持比の関係を、Fig. 4-14に $\alpha_{DB}$ と $\alpha_{CN}$ の関係を示した。圧力15 MPa、温度313 Kでの結果である。充填剤の種類に関係なく、オレイン酸メチルの保持比とパルミチン酸メチルの保持比は直線で相関される。Fig. 4-14は、炭素数に対する選択性が大きい充填剤ほど、二重結合数に対する選択性が小さいことを示している。また、本実験で調製したWN1-WN7のゲルにおけるプロットは一本の曲線上にあるが、市販の充填剤のプロットは曲線から離れている。これは、使用されたベースのシリカゲルの特性の差、リガンドの結合状態の違いによるものと考えられる。市販充填剤のSuper  $\text{NH}_2$ は炭素数、二重結合数に対する選択性が大きい。Fig. 4-14には、圧力12 MPa、20 MPaにおけるWN1-7で得られた曲線も合わせて示した。曲線は、高圧になると左、即ち $\alpha_{CN}$ が減少するようにシフトする。Cosmosil  $\text{NH}_2$ は炭素数に対する選択性が大きい、二重結合数に対する選択性が小さい。

このように、Fig. 4-14の右上にプロットされる充填剤ほど鎖長、不飽和度に対する選択性が高く、脂肪酸エステルの分離に適していると判断できる。エステルのSFC分離の充填剤としてNH<sub>2</sub>シリカ評価には $\alpha_{DB}$  vs.  $\alpha_{CN}$ プロットが有効である。

#### 4-4 結言

結合基量の異なるアミノプロピル基結合シリカゲルを調製し、それを充填剤とするSFCによって脂肪酸エステルの分離を行った。その結果、以下のことが分かった。

- 1) 脂肪酸エステルの保持は充填剤の吸着力の寄与が大きい。アミノプロピル基結合密度の増大により充填剤の極性が低下するが、それとともにエステルの保持も低下した。
- 2) 結合密度が大きくなると、エステルの炭素数に対する選択性は増大し、一方二重結合数に対する選択性は減少した。二重結合数に対する選択性は充填剤の極性(シリカのシラノール基とリガンドのアミノ基の和)に依存し、炭素数に対する選択性はリガンドのプロピル基に依存すると思われる。
- 3) エステルの選択性の移動相密度依存性を調べたところ、炭素数に対する選択性は密度の増大によって減少したが、二重結合数に対する選択性への影響は小さかった。分子サイズに対する選択性は、固定相の働きよりも移動相の働きが大きい。一方、二重結合数に対する選択性は、固定相との相互作用の違いが主であり、またサイズの差が小さいため移動相密度の影響は小さくなる。
- 4) 移動相にヘキサン系混合溶媒を用いた場合、脂肪酸エステルの炭素数による分離は困難であった。これは炭素数に対する選択性は移動相の溶解力に強く依存しているためである。エステルは二重結合数の差に従って分離されたが、その選択性は保持の強さと連動して変化する。SFCでは、圧力をかえることで、二重結合に対する選択性を変化させることなく、保持の強さを大きく変化させることができる。
- 5) 市販の充填剤は、アミノ基結合密度、結合状態、ベースシリカの特性が違うため、その脂肪酸エステルの分離挙動が異なっている。そのような様々なアミノ基結合シリカゲルのSFC分離の充填剤としてのキャラクタリゼーションには、炭素数に対する選択性と二重結合数に対する選択性を測定し相関する事が有効である。同じシリカゲル、試薬を用いて同じ条件で反応を行うと、得られたNH<sub>2</sub>ゲルの $\alpha_{DB}$  vs.  $\alpha_{CN}$ プロットは一本の線上に位置する。他の充填剤の( $\alpha_{DB}$ ,  $\alpha_{CN}$ )のその線からの偏差を比較することにより、脂肪酸エステルの分離剤としての特性を評価することが出来る。



## REFERENCES

- 1) Schwarzenbach, R., *J. Chromatogr.*, **117**, 206 (1976).
- 2) Abbott, S. R., *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 540 (1980).
- 3) Doner, L. W., Biller, L. M., *J. Chromatogr.*, **287**, 391 (1984).
- 4) Ashraf-Khorassan, M., Taylor, L. T., *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 331 (1988).
- 5) Taylor, L. T., Chang, H.-C. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 357 (1990).
- 6) Sakaki, K., "Biochemical Engineering for 2001, Proc. Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1992", Furusaki, S., Endo, I., Matsuno, R. (Editors), Springer-verlag, Tokyo, p.563 (1992).
- 7) Jones, A. D., Burns, I. W., Sellings, S. G., Cox, J. A., *J. Chromatogr.*, **144**, 169 (1977).
- 8) Sakaki, K., Hirata, H., *J. Chromatogr.*, **585**, 117 (1991).
- 9) Unger, K. K., "Porous Silica", Elsevier, Amsterdam (1979).
- 10) Iler, P. K., *J. Chromatogr.*, **209**, 341 (1981).
- 11) Unger, K. K., *J. Chromatogr.*, **125**, 115 (1976).
- 12) Engelhardt, H., Gross, A., Mertens, R., Petersen, M., *J. Chromatogr.*, **477**, 169 (1989).
- 13) Lesellier, E., Tchaplai, A., Pechard, M.-R., Lee, C. R., Krstulovic, A. M., *J. Chromatogr.*, **557**, 59 (1991).
- 14) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., *J. Chromatogr.*, **448**, 87 (1988).
- 15) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., Fukushima, K., Nobuhara, K., *Anal. Sci.*, **5**, 335 (1989).
- 16) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., Sakaki, K., Yokochi, T., *Anal. Chem.*, **61**, 2076 (1989).
- 17) Martire, D. E., *J. Chromatogr.*, **452**, 17 (1988).
- 18) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1779 (1988).
- 19) Bondi, A., "Physical Properties of Molecular Crystals, Liquid, and Gases", Wiley, New York (1968).
- 20) Sakaki, K., Sako, T., Yokochi, T., Sugeta, T., Nakazawa, N., Sato, M., Suzuki, O., Hakuta, T., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **36**, 943 (1987).
- 21) Martire, D. E., Boehm, R. E., *J. Phys. Chem.*, **91**, 2433 (1987).
- 22) Snyder, L. R., "Principles of Adsorption Chromatography", Marcel Dekker, New York, chapter 8 (1968).

Table 4-1 Carbon and nitrogen contents, and bonding densities of prepared packings. Carbon and nitrogen contents were determined by elemental analysis, and bonding density was calculated on the basis of nitrogen content.

Packings	silane:silica ratio (wt%)	C (wt%)	N (wt%)	Bonding density (mmol/g)
Wakosil II	-	1.38	-	-
WN1	5.3	2.82	0.16	0.11
WN2	10.1	3.79	0.58	0.41
WN3	20.6	5.48	1.13	0.81
WN4	26.4	5.97	1.18	0.84
WN5	33.0	5.03	1.13	0.81
WN6	41.1	6.19	1.34	0.96
WN7	52.7	5.34	1.27	0.91
Finesil	-	0.08	-	-
FN1	33.0	3.78	1.08	0.77

Table 4-2 Capacity factor of methyl stearate, selectivity according to carbon number, and selectivity according to the number of double bonds of fatty acid methyl esters with various kinds of liquid mobile phase. Wakosil II and WN4 were used as stationary phases.

mobile phase	volume ratio	$X_S^a)$	$\epsilon^{WS}^b)$	Wakosil II					WN4		
				$k'_{C18:0}^c)$	$\alpha_{CN}^d)$	$\alpha_{DB}^e)$	$k'_{C18:0}^c)$	$\alpha_{CN}^d)$	$\alpha_{DB}^e)$		
benzene-hexane	25 : 75	0.33	0.20				1.70	$\approx$ 1	1.19		
	5 : 95	0.072	0.085				4.08	$\approx$ 1	1.27		
acetone-hexane	0.5 : 99.5	0.0089	0.042	1.10	$\approx$ 1	1.18					
	0.2 : 99.8	0.0036	0.024	2.45	$\approx$ 1	1.19	1.16	$\approx$ 1	1.22		
	0.05 : 99.95	0.00089	0.014	7.89	$\approx$ 1	1.25	3.18	$\approx$ 1	1.26		
ethanol-hexane	0.05 : 99.95	0.0011	0.27	2.67	$\approx$ 1	1.17	0.99	$\approx$ 1	1.19		
	0.02 : 99.98	0.00045	0.19	6.96	$\approx$ 1	1.24	2.33	$\approx$ 1	1.23		

a)  $X_S$  : Mole fraction of strong solvent

b)  $\epsilon^{WS}$  : Solvent strength parameter of binary solvent. See eq. 4-5.

c)  $k'_{C18:0}$  : Capacity factor of methyl stearate at 303 K.

d)  $\alpha_{CN}$  : Selectivity according to carbon number of fatty acid methyl esters.

e)  $\alpha_{DB}$  : Selectivity according to the number of double bonds of fatty acid methyl esters.

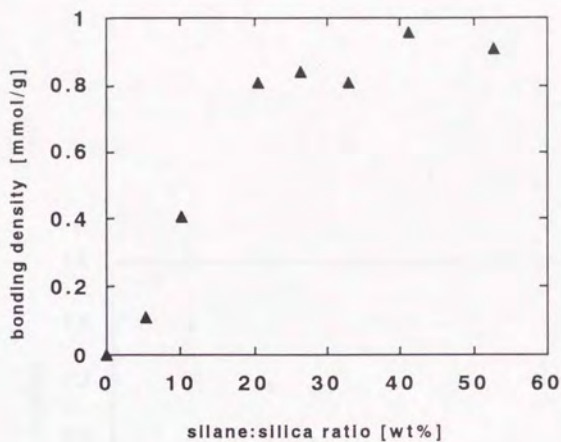


Fig. 4-1 Dependence of aminopropyl bonding density on silane:silica ratio.

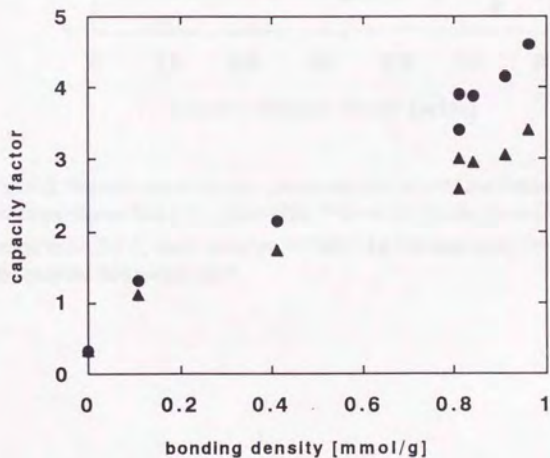


Fig. 4-2 Dependence of capacity factors of glucose and fructose on aminopropyl bonding density in liquid chromatography. (●) glucose, (▲) fructose. Mobile phase: acetonitrile-water (4:1), temperature: 303 K.

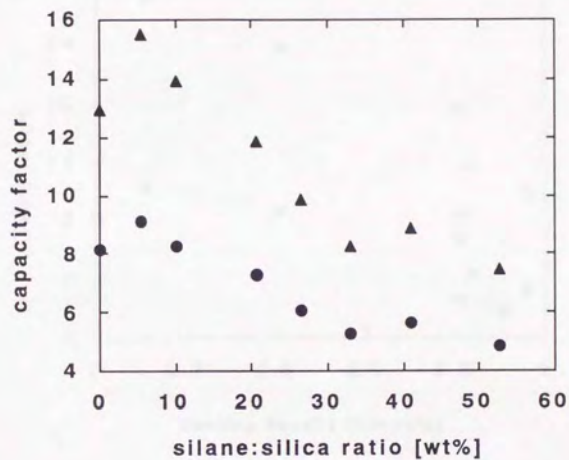


Fig. 4-3 Dependence of capacity factors of palmitic acid and linoleic acid methyl esters on silane:silica ratio. Base silica Wakosil II, mobile phase  $\text{CO}_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa. (▲) linoleic acid methyl ester, (●) palmitic acid methyl ester.

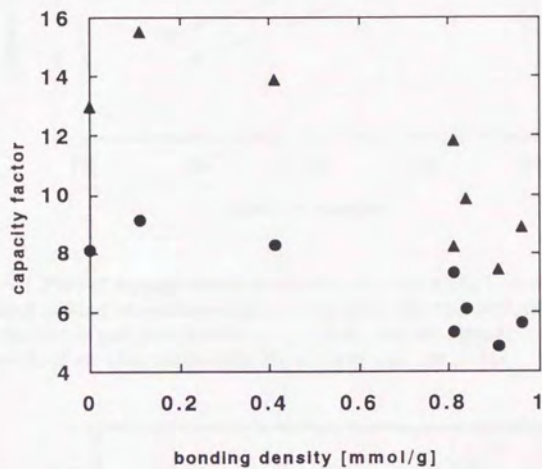


Fig. 4-4 Dependence of capacity factors of palmitic acid and linoleic acid methyl esters on aminopropyl bonding density. (▲) linoleic acid methyl ester, (●) palmitic acid methyl ester. Base silica Wakosil II, mobile phase  $\text{CO}_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa.

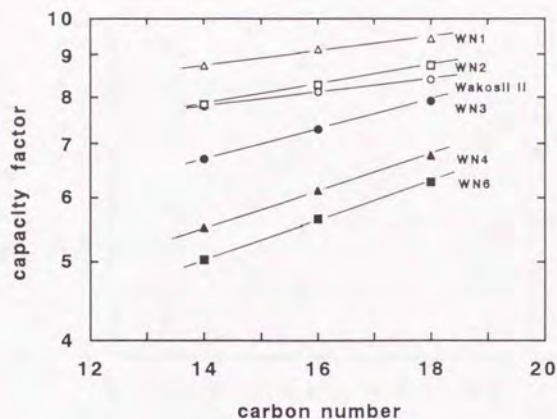


Fig. 4-5 Plots of capacity factors of saturated fatty acid methyl esters on each prepared packing vs. carbon number of fatty acids. Myristic acid, palmitic acid and stearic acid methyl esters were used as samples. Base silica Wakosil II, mobile phase  $\text{CO}_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa.

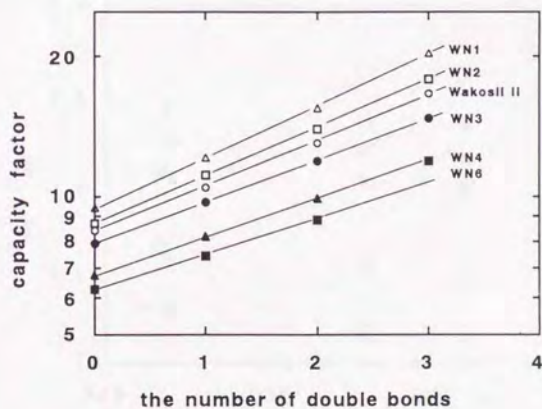


Fig. 4-6 Plots of capacity factors of fatty acid methyl esters on each prepared packing vs. the number of double bonds of fatty acids. Stearic acid ( $\text{C}_{18:0}$ ), oleic acid ( $\text{C}_{18:1}$ ), linoleic acid ( $\text{C}_{18:2}$ ) and  $\alpha$ -linolenic acid ( $\text{C}_{18:3}$ ) methyl esters were used as samples. Mobile phase  $\text{CO}_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa.

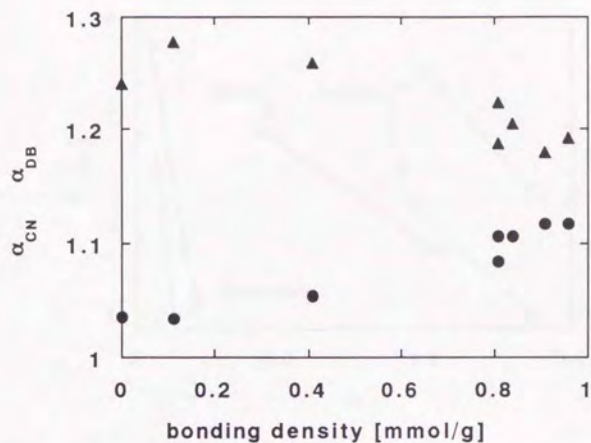


Fig. 4-7 Dependence of  $\alpha_{CN}$  and  $\alpha_{DB}$  on aminopropyl bonding density. (▲)  $\alpha_{DB}$ , (●)  $\alpha_{CN}$ . Mobile phase  $CO_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa.

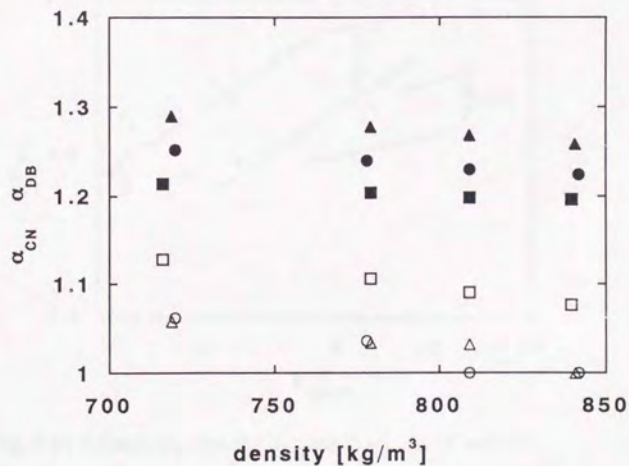


Fig. 4-8 Dependence of  $\alpha_{CN}$  and  $\alpha_{DB}$  on  $CO_2$  density. Column: Wakosil II (○)  $\alpha_{CN}$  (●)  $\alpha_{DB}$ , WN1 (△)  $\alpha_{CN}$  (▲)  $\alpha_{DB}$ , WN4 (□)  $\alpha_{CN}$  (■)  $\alpha_{DB}$ . Mobile phase  $CO_2$ , temperature 313 K.



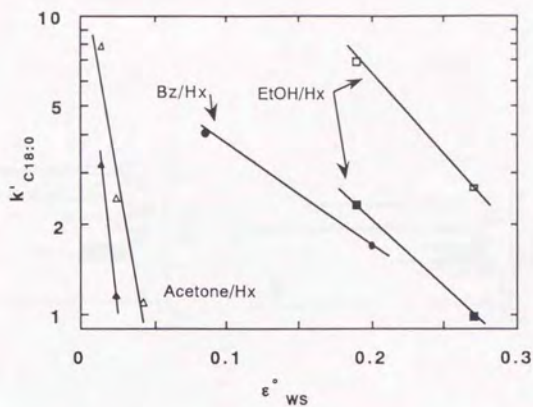


Fig. 4-9 Dependence of capacity factor of methyl stearate on solvent strength parameter of binary liquid solvent on the packings of Wakosil II and WN4. The keys of  $\triangle$  and  $\square$  are for Wakosil II, and  $\bullet$ ,  $\blacktriangle$  and  $\blacksquare$  are for WN4. Temperature is 303 K.

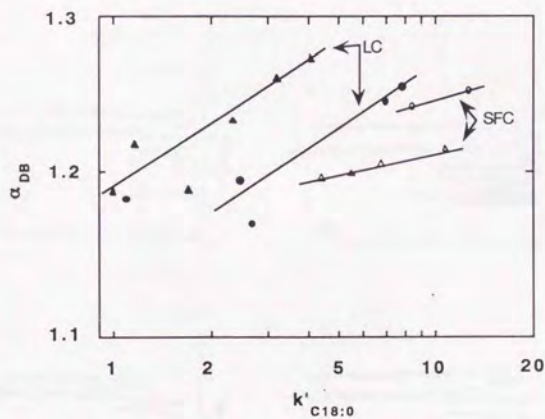


Fig. 4-10 Relationship between  $\alpha_{DB}$  and  $k'_{C18:0}$  in LC and SFC. The keys of  $\circ$  and  $\bullet$  are for Wakosil II, and  $\triangle$  and  $\blacktriangle$  are for WN4. See Table 4-2 for LC conditions. SFC conditions: pressure 15 MPa, temperature 313K.

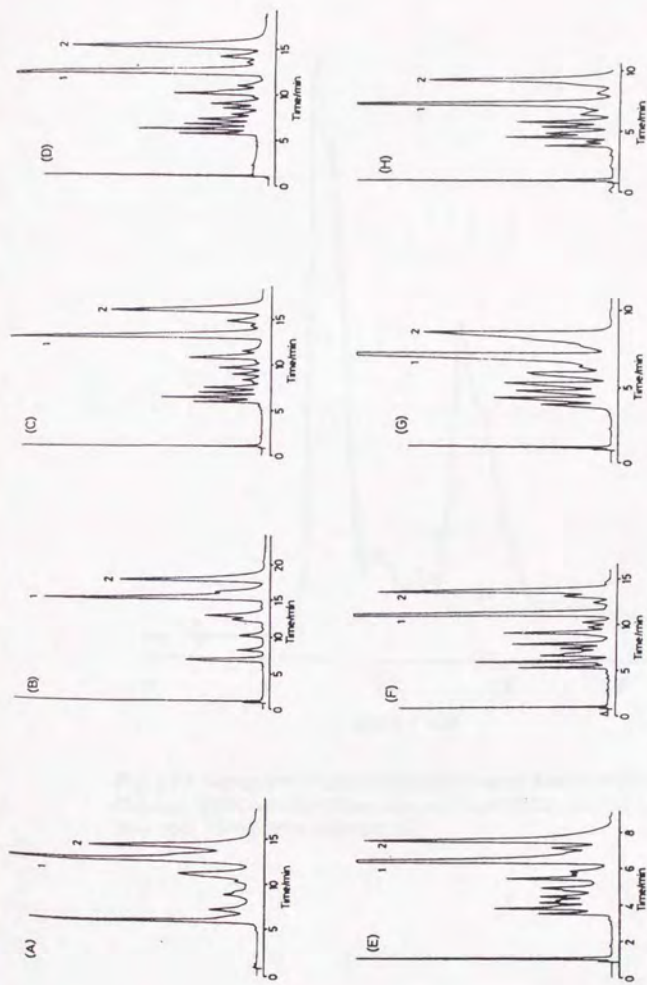


Fig. 4-11 Separation of methyl esters derived from fish oil. Temperature 313 K, flow rate 1.4 L/min. (A) Column Wakosil II, outlet pressure 20 MPa; (B) column WN2, outlet pressure 20 MPa; (C) column WN4, outlet pressure 15 MPa; (D) column WN6, outlet pressure 15 MPa; (E) column FN1, outlet pressure 15 MPa; (F) column Super NH<sub>2</sub>, outlet pressure 15 MPa; (G) column Wakosil NH<sub>2</sub>, outlet pressure 12 MPa; (H) column Cosmosil NH<sub>2</sub>, outlet pressure 10 MPa. 1 = icosapentaenoic acid (C20:5) methyl ester; 2 = docosahexaenoic acid (C22:6) methyl ester.

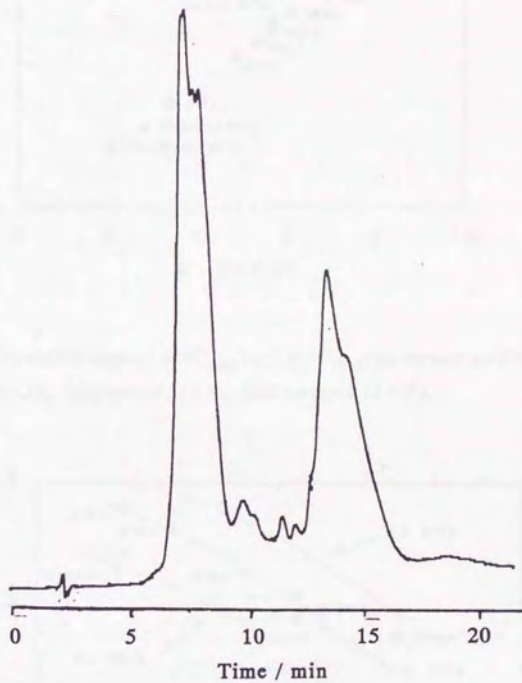


Fig. 4-12 Separation of fatty acid methyl esters derived from fish oil by HPLC. Column, WN4; mobile phase, ethanol/hexane (0.02 : 99.98); temperature, 303 K; flow rate, 1.0 mL/min; detector, RI.

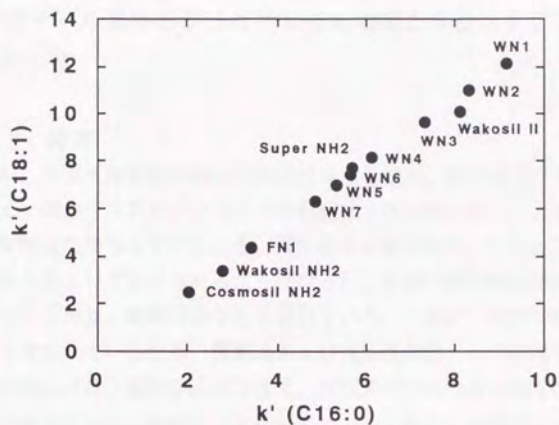


Fig. 4-13 Correlation between  $k'(C_{18:1})$  and  $k'(C_{16:0})$  on various packings. Mobile phase  $CO_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa.

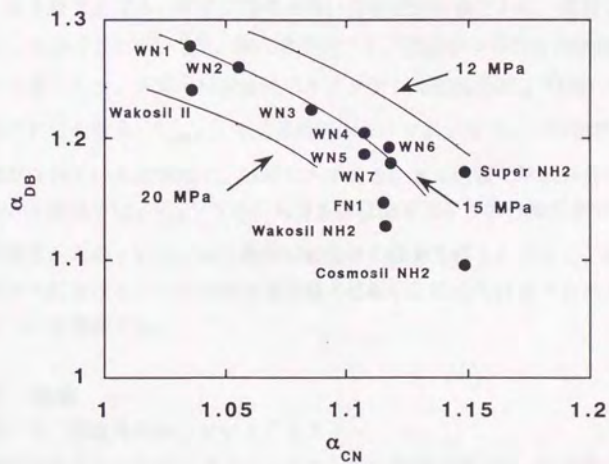


Fig. 4-14 Correlation between  $\alpha_{DB}$  and  $\alpha_{CN}$  on various packings. Mobile phase  $CO_2$ , temperature 313 K, outlet pressure 12, 15 and 20 MPa.

## 第五章

### オクタデシル基結合シリカゲルを充填剤とするSFCによる脂肪酸エステル分離

#### 5-1 緒言

近年、多価不飽和脂肪酸の生体内における機能、例えばアラキドン酸、イコサペンタエン酸がプロスタグランジンの前駆体となっていること、ドコサヘキサエン酸が学習機能に関与していること、等が徐々に解明され、それとともに医薬品および機能性食品として注目されるようになった。多価不飽和脂肪酸は、天然に豊富に存在している魚油、植物油の中に含まれている。一般に、天然油脂中には他の脂肪酸も多く含まれているため、医薬品および機能性食品として利用するには、目的とする脂肪酸の単離、濃縮が必要となる。超臨界流体抽出法は脂質の有効な分離法であり、中性脂質とリン脂質のように物性の大きく異なる物質の分離に適している<sup>1)</sup>。しかし、類似した脂肪酸間の分画は超臨界流体抽出法だけでは困難であり、硝酸銀と二重結合の親和性を利用する方法<sup>2)</sup>、温度勾配をつけた充填塔を用いる方法<sup>3-5)</sup>等を用いることで分離能を高める工夫がされている。

ここでは、脂肪酸エステルの分取方法として超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)法を取り上げる。SFCはその高い分離能が特徴であり、類似した物質の分画法として期待されている<sup>6)</sup>。第四章ではアミノ基結合シリカを充填剤とするSFCについて論じたが、本章では非極性のオクタデシル基結合( $C_{18}$ , ODS)シリカを充填剤とするSFCを扱う。 $C_{18}$ シリカは逆相液体クロマトグラフィーの固定相として最も広く使用されている充填剤で、容易に入手でき、また脂質化学の分野でも汎用されている。本研究では、 $C_{18}$ シリカにおける脂肪酸エステルの分離挙動を調べ、糸状菌由来の脂質からの $\gamma$ -リノレン酸の分取条件の探索を行う。さらに、液体クロマトグラフィーにおけるエステルの分離挙動と比較し、両者の分離メカニズムの違いと特徴について考察する。

#### 5-2 実験

##### 5-2-1 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(日本分光SUPER-100, Fig. 1-3参照)を装置として用いた。検出器として耐圧セル付きUV検出器(日本分光MULTI-320)を用い、195-350 nmの吸光度を測定した。移動相流体として二酸化炭素を用い、またモディ

ファイアーとしてメタノールを使用した。カラムにはSuperpak Sil C<sub>18</sub> (モノメリックタイプ、粒経5 μm, 250 x 10 mm I. D., 日本分光製)、および自家製のMTHV (モノメリックタイプ、粒経5 μm, 炭素含量15.1%, 150 x 4.6 mm I. D.)を用いた。温度308-313 K、圧力8.8-28 MPa、流速約5.4 g/min (Superpak Sil C<sub>18</sub>)、1.8 g/min (MTHV) で分離を行った。

### 5-2-2 液体クロマトグラフィー

カラムにMTHVを用いた。移動相にアセトニトリル、メタノール、アセトニトリル/メタノール系、メタノール/水系を用い、温度303 K、流速1.0 mL/minでエステルの分離を行った。検出器にRI検出器 (RI-3H、日本分析製)を用いた。

### 5-2-3 試料

脂肪酸メチルエステルの標準試料として、ミリスチン酸メチル(C<sub>14:0</sub>)、パルミチン酸メチル(C<sub>16:0</sub>)、パルミトレイン酸メチル(C<sub>16:1</sub>)、ステアリン酸メチル(C<sub>18:0</sub>)、オレイン酸メチル(C<sub>18:1</sub>)、リノール酸メチル(C<sub>18:2</sub>)、γ-リノレン酸メチル(C<sub>18:3</sub>)、11-エイコセン酸メチル(C<sub>20:1</sub>)、ホモγ-リノレン酸メチル(C<sub>20:3</sub>)、アラキドン酸メチル(C<sub>20:4</sub>)、エルカ酸メチル(C<sub>22:1</sub>) (以上サーダリー社製)、及び遊離のイコサペンタエン酸(C<sub>20:5</sub>) (東洋醸造製)をメチルエステル化したものを用いた。

また、モルティエレラ属糸状菌から抽出された脂質を水酸化カリウムを触媒としてメタノール中で加熱攪拌し、得られた脂肪酸メチルエステル混合物を試料とした。その組成をTable 5-1に示す。

## 5-3 結果と考察

### 5-3-1 SFCにおける脂肪酸メチルエステルの溶出挙動

クロマトグラフィーにおける保持比は次式で定義される。

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (5-1)$$

SFCでは移動相は圧縮性の流体であるので、溶媒がカラムを通過する時間 $t_0$ は次のように算出した。まずアセトニトリルを移動相とする液体クロマトグラフィーで分離を行い、溶媒ピークの時間からカラム内体積を求める。そしてSFCでは、入口と出口における密度の加算平均をカラム内平均密度とし、質量流速、カラム内体積から $t_0$ を求める。

飽和脂肪酸のミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、及び二重結合数1の

バルミトレイン酸、オレイン酸、11-エイコセン酸、エルカ酸について、保持比の対数と炭素数の関係をFig. 5-1に示した。図中、圧力はカラム出口での圧力を示す。炭素数14-22の範囲では、保持比の対数は炭素数と直線関係にある。圧力8.8 MPa, 13.7 MPaにおける炭素数1当たりの $k'$ の変化をTable 5-2に示した。

炭素数16、18、20の脂肪酸について、保持比の対数と二重結合数の関係をFig. 5-2に示す。保持比の対数と二重結合数は直線関係にある。圧力8.8 MPa, 13.7 MPaにおける二重結合数1当たりの $k'$ の変化をTable 5-2に示した。Table 5-2から次のことが分かる。

- 1) 圧力の増大によって、 $\log k'$  vs. CNの傾きは小さくなる。一方、 $\log k'$  vs. DBの傾きは負に大きくなる。
- 2)  $\log k'$  vs. CNの傾きは、二重結合数が少ない同族体ほど大きくなる。 $\log k'$  vs. DBの傾きは炭素数の小さいエステル群ほど大きな値となる。

これらをMartireの式を用いて考察する。Martireは格子流体モデルを用いて、非極性の化学結合型充填剤におけるSFCの保持を次の式で表した(式3-7、3-8、3-9の再掲)<sup>7,8)</sup>。

$$\ln K = \ln K_0 + F(T_R, \rho_R) \quad (5-2)$$

$$\ln K_0 = \left(\frac{r_a}{r_b}\right)\left(\frac{r_b}{r_d} - r_b\right) + \frac{(1 + \sqrt{r_b})^2}{T_R} \left(\frac{r_a}{r_b}\right)\left(\frac{\epsilon_{ad}}{\epsilon_{bb}} - \frac{\epsilon_{dd}}{2\epsilon_{bb}}\right) \quad (5-3)$$

$$F(T_R, \rho_R) = \left(\frac{r_a}{r_b}\right)\left[(\sqrt{r_b} - 1)\rho_R - (\sqrt{r_b} + 1)\left(\frac{\epsilon_{ab}}{\epsilon_{bb}}\right)\left(\frac{\rho_R}{T_R}\right) + \left(\frac{\rho_R^2}{2T_R}\right)\right] \quad (5-4)$$

ここで $\rho_R$ は還元密度、 $T_R$ は還元温度、 $r_i$ は分子 $i$ のセグメント数、 $\epsilon_{ij}$ は分子 $i$ と $j$ の間の近接セグメント間の相互作用エネルギー、添字の $a$ 、 $b$ 、 $d$ はそれぞれ溶質、溶媒、固定相を示す。式5-3、5-4から $\partial(\ln K)/\partial r_a$ は一定温度、圧力で定数になり、 $r_a$ は炭素数に比例すると見なすことができるので、 $\log k'$  vs. CNは直線になる。また上式から、保持が密度の増大に対して減少するような密度範囲では、圧力(密度)の増大により $\log k'$  vs. CNの傾きが減少することが分かる。二重結合数が0と1の場合で $\log k'$  vs. CNの傾きが異なるが、原因として $\epsilon_{ad}$ と $\epsilon_{ab}$ が二重結合数によって違っていることが考えられる。

また、 $\log k'$  vs. DBは直線になるが、これは $\epsilon_{ad}$ と $\epsilon_{ab}$ が二重結合数に対して直線的に変化するためと考えられる。また、 $r_a$ も不飽和度によって変化する。Bondiによると、メチレン基(-CH<sub>2</sub>-)のvan der Waals体積は10.23 cm<sup>3</sup>/mol、(-CH=)は8.47 cm<sup>3</sup>/molで

あり<sup>9)</sup>、一個の二重結合により $(10.23 - 8.47) \times 2 = 3.52 \text{ cm}^3/\text{mol}$ の分子体積の減少が生じることになる。これは、炭素数1個の減少分の約1/3であるが、二重結合1個分の保持比の減少は、炭素数1個分の保持比の変化の1/3以上であるので、 $\epsilon_{ad}$ と $\epsilon_{ab}$ の不飽和度による変化も保持に寄与していることが分かる。log  $k'$  vs. DBの傾きは、エステルの炭素数が小さい方が大きくなる。これは $\epsilon_{ad}$ と $\epsilon_{ab}$ の二重結合数に対する変化が炭素数に依存しているためと考えられる。定義では、 $\epsilon_{ad}$ と $\epsilon_{ab}$ は溶質の各セグメントと固定相および溶媒のセグメントとの相互作用エネルギーを表しており、不飽和のエステル全体を考えた場合、 $(-\text{CH}_2)$ と $(-\text{CH}=\text{)}$ の寄与の合計をセグメント数で割ったものと捉えることができる。セグメント数が増えれば、一個当たりの二重結合によるセグメント間相互作用エネルギーへの寄与は小さくなる。圧力の増大によってlog  $k'$  vs. DBの傾きは変化するが、log  $k'$  vs. CNの傾きほど影響されない。これは、 $r_a$ の変化が小さいためと考えられる。圧力の効果については後節で論じる。

本実験で用いたエステルにおいて、log  $k'$  vs. DBの傾きとlog  $k'$  vs. CNの傾きの比は、8.8 MPaで0.5-0.7、13.7 MPaで0.63-0.85である。即ち、二重結合一個当たり、炭素数約(2/3)に相当する。実際、 $C_{16:0}$ と $C_{18:3}$ 、 $C_{18:0}$ と $C_{20:3}$ 、 $C_{18:1}$ と $C_{20:4}$ 、 $C_{18:2}$ と $C_{20:5}$ がほぼ同じ保持比を持つことが分かった。そこで $\text{PN}_{\text{SFC}} = \text{CN} - (2/3)\text{DB}$ と定義して、各脂肪酸エステルの保持比の対数と $\text{PN}_{\text{SFC}}$ の関係を求めたところ、Figs. 5-3、5-4のように整理された。各々の直線は、同じ炭素数で異なる二重結合数を持つ脂肪酸のプロットを結んだものである。313 Kで圧力8.8、13.7 MPa、308 Kで8.8 MPaの場合、各々の点はほぼ1本の直線にまとめられると言える。しかし308 Kで13.7 MPaの場合、この関係はくずれ、 $C_{18:2}$ は $C_{16:0}$ と、 $C_{18:3}$ は $C_{16:1}$ とほぼ同じ保持比を示すようになる。このことより、SFCにおける溶出特性は温度、圧力の影響を受け、適当な条件を選ぶことにより分離度の向上が可能であることが分かる。

またSFCでは、モディファイアーとして少量のアルコール類や、炭化水素系溶媒を添加することにより、分離性能を向上させることが可能である。そこでメタノールを添加した時の、保持比の対数と $\text{PN}_{\text{SFC}}$ の関係をFig. 5-5に示した。保持時間は短縮し、また、 $\text{PN}_{\text{SFC}}$ で整理された脂肪酸エステルの溶出順序は、モディファイアー効果により変化することが認められた。308 K、およびメタノール添加時の、炭素数、二重結合数によるlog  $k'$ の変化をTable 5-3に示す。圧力の増大、メタノール添加によって、log  $k'$  vs. DBの傾きとlog  $k'$  vs. CNの傾きの比は1に近付くことが分かる。



### 5-3-2 SFCによる $\gamma$ -リノレン酸の分離、分取

モルティエラ属糸状菌由来の脂肪酸エステル混合物をSFCで分離したときのクロマトグラムをFig. 5-6に示す。30 wt%含まれているパルミチン酸は、紫外域での吸収が小さいためグラフ上に現れてこないが前節で述べたように $\gamma$ -リノレン酸とほぼ同じ保持時間を持っている。SFCで $\gamma$ -リノレン酸を高度に分離精製するにはパルミチン酸を除く必要があり、そのための温度、圧力の条件探索を行った。

パルミチン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸について保持比と密度の関係をlog-logプロットとしてFig. 5-7に示す。カラムの圧力損失が約2.0 MPaあるが、出口密度と入口密度の数値平均を代表値とした。同一温度で密度が0.6 g/cm<sup>3</sup>以上では、保持比の対数は密度の対数に対してほぼ直線関係になっている。なお、0.5 g/cm<sup>3</sup>以下の密度では、ピークが広がりすぎるため分離が困難になり、一方密度が0.8 g/cm<sup>3</sup>以上では、ピーク間隔が短くなるため分取が困難になり、また耐圧性の問題が生じる。よってこの密度範囲が実用的であると言える。さらに、以上の結果を $\gamma$ -リノレン酸に対する分離係数 $\alpha$  (=各脂肪酸の保持比/ $\gamma$ -リノレン酸の保持比)と密度の関係として整理した(Fig. 5-8)。リノール酸の $\gamma$ -リノレン酸に対する分離度はほぼ一定値を示し、密度に対する変化は小さい。一方、パルミチン酸は低密度で $\gamma$ -リノレン酸と等しい保持比を持つが、高密度になるに従い、リノール酸の保持比に近づく。パルミトレイン酸は低圧では $\gamma$ -リノレン酸と離れて溶出するが、密度の増大とともに $\gamma$ -リノレン酸の保持に近づく。ただし高い移動相密度では、各脂肪酸のピークが接近するため分取が困難となる。圧力の分離係数に及ぼす影響については、後節で詳述する。

以上のような検討より、Table 5-4に示す条件で $\gamma$ -リノレン酸メチルエステルの分取を行い、得られた成分の組成と回収率を測定した。その結果をTable 5-4に合わせて示した。308 K、圧力9.8 MPaで $\gamma$ -リノレン酸は、ほぼ100%の回収率で99.0%に濃縮可能である。また圧力が高いほど溶出時間は短縮されるが、各ピークの重なりが大きくなるため、収率、純度は低下した。

### 5-3-3 液体クロマトグラフィーにおける脂肪酸メチルエステルの溶出挙動

カラムにMIHVを用いて、LCにおけるエステルの保持比と炭素数、二重結合数の関係を調べ、その結果をFigs. 5-9, 5-10に示した。どの溶媒系でも、log  $k'$ とCNの間に直線関係があるが、その傾きは移動相溶媒に依存する。log  $k'$ はDBの増大によって減少するが、DB=0→1の減少分は1→2の減少分よりも大きくなる。各溶媒で得られたC<sub>18:0</sub>の保持比、log  $k'$ の炭素数による増大、二重結合による減少をTable 5-5に示した。SFCと比較すると、二重結合数に対する選択性が大きいことが分かる。

Warthenは、LCにおいて二重結合一個分は炭素数二個に相当することを報告している<sup>10)</sup>。また単純な溶媒系では脂肪酸エステルの溶出順は $PN_{LC} = CN - 2DB$ に従うが、混合溶媒系ではこの溶出順をずらすことができる<sup>11)</sup>。本実験で用いた溶媒では、 $C_{18:0}$ と $C_{18:1}$ を考えると、DBの係数は1.6-2.0の間にある。

二成分系溶媒を移動相とする逆相液体クロマトグラフィーの保持は、Martireによって与えられている。これは格子流体モデルを用いて導かれたが、移動相成分の固定相への溶け込みがないと仮定すると、次式が得られる。

$$\ln K_{b+c} = \ln K_c + r_a \left( \frac{1}{r_c} - \frac{1}{r_b} \right) \theta_b + r_a [\chi_{ab} - \chi_{ac} - \chi_{bc}] \theta_b + \chi_{bc} \theta_b^2 \quad (5-5)$$

$$\ln K_c = r_a \left( \frac{1}{r_d} - \frac{1}{r_c} \right) + r_a (\chi_{ac} - \chi_{ad}) \quad (5-6)$$

$$\chi_{ij} = \frac{z}{k_B T} \left( \epsilon_{ij} - \frac{\epsilon_{ii} + \epsilon_{jj}}{2} \right) \quad (5-7)$$

ここで添字のa、b、c、dはそれぞれ溶質、強溶媒、弱溶媒、固定相を表し、 $\theta_b$ はb成分の体積分率、 $\chi$ は相互作用パラメーター、 $z$ は近接分子数、 $k_B$ はボルツマン定数を示す。移動相が純成分ならば、式5-6、5-7よりcをbに替えて

$$\ln K_b = r_a \left( \frac{1}{r_d} - \frac{1}{r_b} \right) + \frac{r_a z}{k_B T} \left( \epsilon_{ab} - \epsilon_{ad} - \frac{\epsilon_{bb} - \epsilon_{dd}}{2} \right) \quad (5-8)$$

同じ溶媒系では $\ln K_b$ は $r_a$ に比例することから、 $\ln k'$  vs. CNの直線性が説明できる。溶媒が変わると、式5-8で $\epsilon_{ab}$ 、 $\epsilon_{bb}$ が変化するため保持比は変わる。

二重結合の保持への寄与は、 $r_a$ 、 $\epsilon_{ab}$ 、 $\epsilon_{ad}$ の項に現れる。前節で論じたように、二重結合が一つ増えることによる分子体積の減少は、メチレン基の1/3個分の体積に相当する。液体溶媒では、二重結合の保持への寄与は最大で炭素数2に相当することから、サイズの項 $r_a$ よりも相互作用の項 $\epsilon_{ab}$ 、 $\epsilon_{ad}$ が重要であると言える。また、 $CO_2$ と液体溶媒で二重結合の保持への寄与が大きく異なることから、 $\epsilon_{ab}$ の項が最も選択性に重要であると言える。 $CO_2$ は非極性分子であり、一方逆相LCで用いられる液体溶媒は極性であることから、二重結合に対する選択性は溶媒の極性に関与していると推察できる。

#### 5-3-4 エステルの保持および選択性と移動相密度の関係

SFCでは通常、圧力あるいは密度を制御することで溶質の保持を変える。液体クロマトでは溶離液の種類および組成を変えることで保持の強さを制御するが、S

FCではより簡単な方法で移動相の溶媒力を調節することができる。そこで、サンプルとしてステアリン酸メチルを用い、保持比と移動相密度の関係を調べた。カラムにはMTHVを用い、その313 Kでの結果をFig. 5-11に示した。図に示されるように保持比の対数は密度の対数に対して直線となる。両者の関係は次式のように表された。

$$\ln k' = -5.40 \ln \rho - 0.589 \quad (5-9)$$

$\rho$ は密度で単位は $[\text{g}/\text{cm}^3]$ である。これは、すでに3章で示したように、溶解度の対数が密度の対数に対して直線的になり(Chrastilのモデル、式3-1)、また保持比の対数が溶解度の対数に対して直線的になる(Bartleの式3-11、3-12)時に成立する<sup>12-14</sup>)。Chrastilの式は、溶質が溶媒分子と溶媒和して溶解するというモデルに基づいて導出された。また、Bartleの式は、移動相の圧力変化が固定相に影響を及ぼさない、即ち移動相の固定相への吸着、吸収が無視できるという仮定に基づいている。本実験の結果から、脂肪酸エステルのSFC分離において、密度 $0.6-0.9 \text{ g}/\text{cm}^3$ の範囲で以上の仮定がほぼ成立していると言える。しかし、Schoenmakersは広い密度範囲では保持比の対数は密度の2次関数的になることを報告している<sup>15</sup>)。Chrastilのモデルでは溶媒溶質分子間の相互作用だけを考え、溶媒分子間の相互作用は考慮されていないが、高密度になると溶媒分子間の相互作用が大きくなり、溶質が溶媒中に溶けにくくなることが考えられる。実際、オクタデカノール、ステアリン酸の超臨界 $\text{CO}_2$ への溶解度は高密度では低下することが報告されている<sup>16</sup>)。Martireによると、超臨界流体を移動相とする分配クロマトグラフィーにおける溶質の保持は還元密度の二次関数で表される(式5-2、5-3、5-4)。Fig. 5-12に保持比と還元密度の関係をプロットした。 $\text{CO}_2$ の臨界密度、臨界温度はそれぞれ $0.468 \text{ g}/\text{cm}^3$ 、 $304.2 \text{ K}$ である。プロットを二次関数に当てはめるため、次のようにパラメーターを求めた。Bondiの表から、ステアリン酸メチルのvan der Waals体積は $206.2 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と計算される。 $\text{CO}_2$ のvan der Waals体積は $19.7 \text{ cm}^3/\text{mol}$ であり、 $r_a/r_b$ を両者の体積比と考える。Martireによると $r_a=4.41$ がよい結果を与える<sup>7</sup>)。 $T_R = 1.0296$ としてフィッティングすることで次式が得られた。

$$\ln k' = 20.22 - 20.26\rho_R + 5.1\rho_R^2 \quad (5-10)$$

なお、 $k' = \phi K$ であり、 $\phi$ はカラムの相比である。これより、 $\varepsilon_{ab}/\varepsilon_{bb}$ は $0.962$ 、保持比は $\rho_{R\min} = 1.99$  ( $\rho_{\min} = 0.93 \text{ g}/\text{cm}^3$ )で最小になる。Martireが $n\text{-C}_{15}\text{H}_{32}-\text{CO}_2$ で導いた値は、 $\varepsilon_{ab}/\varepsilon_{bb} = 0.884$ 、 $\rho_{R\min} = 0.75$ であり、アルカンとエステルでは異なった値が得ら

れた。

次に、脂肪酸エステルの選択性の圧力依存性について考える。ここでは、エステル間の選択性を炭素数に関する選択性と二重結合数に対する選択性に分けて考え、次のように定義することにする。

$$\alpha'_{\text{CN}} = \exp[\text{slope of the plot of } \ln k' \text{ vs. carbon number}]$$

$$\alpha'_{\text{DB}} = \exp[\text{slope of the plot of } -\ln k' \text{ vs. the number of double bonds}]$$

ただし、 $\alpha'_{\text{CN}}$ の算出には $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ のメチルエステルを用い、 $\alpha'_{\text{DB}}$ の算出には $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ のメチルエステルを用いた。なお、カラムにはMTHVを用い、温度313 Kにおける値である。上記の選択性と移動相密度の関係をFig. 5-13に示した。本実験の密度範囲では、 $\alpha'_{\text{CN}}$ は密度の増大によって減少し、逆に $\alpha'_{\text{DB}}$ は増大する傾向がある。 $\alpha'_{\text{CN}}$ の密度の増大による減少は式5-3、5-4によって説明される。

$(\partial \ln K / \partial r_a)$ は密度の関数となるが、 $K$ が密度の増大に対して減少傾向を示す範囲では、

$(\partial \ln K / \partial r_a)$ は密度の増大に対して減少する。 $r_a$ は炭素数の一次関数であり、また長鎖のエステルでは炭素数の変化による $(\epsilon_{ab}/\epsilon_{bb})$ の変化は少ないと考えられるので、

$(\partial \ln K / \partial n_a)$ の密度変化は、 $(\partial \ln K / \partial r_a)$ の場合と同様になる。 $\alpha'_{\text{CN}}$ は溶質の体積の違いによる選択性と言える。

$-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ のvan der Waals体積は $20.46 \text{ cm}^3/\text{mol}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ のvan der Waals体積は $16.94 \text{ cm}^3/\text{mol}$ なので<sup>9)</sup>、二重結合の増大によって溶質の体積は $-\text{CH}_2-$ 基の約1/3分減少する。本実験の密度範囲では、体積の違いによる選択性は密度の増大によって減少するので、 $\alpha'_{\text{DB}}$ の密度の増大につれての上昇には他の要因があると考えられる。式5-4で $r_a$ が一定の溶質間の選択性を考えると、

$$\frac{\partial \ln K}{\partial (\epsilon_{ab}/\epsilon_{bb})} = -\frac{r_a(1+\sqrt{r_b})}{r_b} \frac{\rho_R}{T_R} \quad (5-11)$$

もし、 $(\epsilon_{ab}/\epsilon_{bb})$ が二重結合数に対して一次関数的であるならば、二重結合数に関する選択性は密度の関数であり、密度の増大によって増加することが分かる。本実験の結果は、 $\alpha'_{\text{DB}}$ は溶質-溶媒間の相互作用に依存していることを示している。

以上のように、SFCにおけるエステルの保持、選択性は移動相密度の影響を受けるが、その依存性はChrastilのモデルとBartleの式、およびMartireの式によって説明できることが分かる。

### 5-3-5 移動相物性の保持選択性に及ぼす効果

溶質の保持、選択性を変えるには、SFCでは圧力操作によって、LCでは溶離液の種類、組成を変えることによって達成される。非極性充填剤におけるクロマト分離では、移動相の保持に与える影響は、格子流体モデルを用いたMartireの式（SFCでは式3-7、3-8、3-9、LCでは式3-16、3-17、3-18）によって統一的に説明されている。そこでは格子間の相互作用エネルギー $\epsilon_{ij}$ および $\chi$ パラメーターが用いられているが、実際の物質ではこれらのパラメーターは一般には与えられていないため、物質の実際の分離挙動を予測、説明するには不十分である。また、前節で示したように、エステルの上二重結合に対する選択性はLCの方がSFCよりも大きくなるが、移動相のどのような物性が不飽和度の選択性に影響しているか明確に示すためには、一般に知られている物性のパラメーターを導入する必要がある。本節では、溶解パラメーターの概念を用いて、SFCおよびLCの分離挙動を比較する。

純粋な溶質を基準にとると、溶液状態でのその溶質のギブス自由エネルギーは次のように表される。

$$G = G^\circ + RT \ln a = G^\circ + RT \ln X + RT \ln \gamma \quad (5-12)$$

ここで、 $a$ は活量係数、 $X$ はモル分率、 $\gamma$ は活量係数である。上式の右辺第2項は excess free energyであり、 $G^E = RT \ln \gamma$  である。従って、溶質が移動相から固定相に移動する場合の自由エネルギー変化は

$$\Delta G = RT \ln X_s + G_s^E - (RT \ln X_m + G_m^E) \quad (5-13)$$

となる。ここで、添え字の $s$ 、 $m$ はそれぞれ固定相、移動相を表す。平衡では、 $\Delta G = 0$  なので、

$$\Delta G^E = G_s^E - G_m^E = -RT \ln \left( \frac{X_s}{X_m} \right) = -RT \ln K_x \quad (5-14)$$

ここで、 $K_x$ はモル分率基準の分配係数である。保持比と分配係数の間には次の関係がある。

$$k' = K_x \frac{n_s}{n_m} \quad (5-15)$$

ここで、 $n_s$ 、 $n_m$ は移動相固定相のモル数である。さらに次の仮定を置く。

- 1) 混合において体積変化が無視できる。
- 2) エントロピー効果が無視でき、分子の配列化が起こらないものとする。

このとき、 $\Delta G^E = \Delta E^E$  となる。 $E^E$ はexcess internal energyである。 $\Delta E^E$ は溶解パラメーター $\delta$ を用いて次のように表される。

$$-\Delta E^E = v_i [(\delta_i - \delta_m)^2 - (\delta_i - \delta_s)^2] \quad (5-16)$$

$v_i$ は溶質のモル体積である。従って、保持比は

$$\ln k' = \frac{v_i}{RT} [(\delta_i - \delta_m)^2 - (\delta_i - \delta_s)^2] + \ln \frac{n_s}{n_m} \quad (5-17)$$

となる。 $n_m = V_m \rho / M$  ( $V_m$ は移動相体積、 $M$ は移動相の分子量)なので、

$$\ln \frac{\rho k'}{M} = \frac{v_i}{RT} [(\delta_i - \delta_m)^2 - (\delta_i - \delta_s)^2] + \ln \frac{n_s}{V_m} \quad (5-18)$$

となる。そこで、SFCおよびLCにおけるステアリン酸メチルの $\rho k'/M$ 値を移動相の溶解パラメーターに対してプロットした (Fig. 5-14)。なお、混合物の場合は $\rho k'(x_1/M_1 + x_2/M_2)$ とした。 $x_i$ は質量分率である。液体の溶解パラメーターは文献から得た<sup>17)</sup>。混合物の場合は $\delta = \phi_1 \delta_1 + \phi_2 \delta_2$ とし、 $\phi_i$ は体積分率である。超臨界CO<sub>2</sub>の溶解パラメーターはAlladaの方法によった<sup>18)</sup>。溶解パラメーターは、その定義から単位体積当たりの凝集エネルギーなので、流体のエンタルピー、圧縮係数から求めることができる (式2-2)。ステアリン酸メチルの溶解パラメーターは、Table 5-7に示したグループ寄与から次式によって推算できる。

$$\delta = \left( \sum_i zF_i + 276.3 \right) / V \quad (5-19)$$

各密度におけるCO<sub>2</sub>および液体、エステルの溶解パラメーターをTable 5-8に示した。式5-18によると、 $\rho k'/M$ の対数は移動相の溶解パラメーターの二次関数となるが、実際のSFC、LCの結果では二次関数的ではなく、またアセトニトリル-メタノール系では、溶解パラメーターの小さいアセトニトリルの方が大きい保持を与える。また、極性の液体溶媒は高い $(\delta_i - \delta_m)^2$ 値を示すが、その $\rho k'/M$ 値はCO<sub>2</sub>の値から予測される値よりも小さくなる。移動相がCO<sub>2</sub>の場合、 $\ln(\rho k'/M)$  vs.  $\delta_m$ プロットが二次関数にならない理由として、次のことが考えられる。

- 1) カラムの入口、出口の移動相密度の算術平均を代表密度としたが、低い圧力では両者の密度差が大きくなり、代表値として適さなくなる
- 2) 溶解パラメーターの定義で自由混合を仮定しているが、実際には混合による体積変化があること。特に臨界点付近で顕著であることが報告されており<sup>15,16)</sup>、溶質の回りにCO<sub>2</sub>分子が凝集、溶媒和するため体積が減少する。

また、極性液体の場合、 $\Delta G^E = \Delta E^E$ の仮定は成り立たない。これはエントロピー効果が無視できないためであり、内部エネルギーの一部は分子の配列のエントロピー

変化に費やされるため、自由エネルギーは内部エネルギーよりも小さくなる。この違いが、メタノールとアセトニトリルにおける保持の違いに影響していると考えられる。メタノールはその水素結合性のためにエントロピー効果が大きいものと考えられる。一方、 $\text{CO}_2$ は無極性であるため分子の配列は無視できる。このエントロピー効果のために、LCでは $(\delta_1 - \delta_m)^2$ が大きいにもかかわらず、SFCから予測される保持よりも小さくなる。

空間形成のエネルギーについてさらに考察を加える。Horvathによると、液体中に空間を形成するエネルギーは次式で表される(式3-6)<sup>21,22</sup>。

$$\Delta G_c = N A_s \gamma (\kappa^e - 1) + N \Delta A_x \gamma \quad (5-20)$$

ここで $N$ はアボガドロ数、 $\gamma$ は表面張力、 $\Delta A_x$ は溶質とリガンドの会合による表面積の変化、 $A_s$ は溶媒分子の表面積、 $\kappa^e$ は表面張力を分子の次元にあわせるための因子である。溶質分子が溶媒分子よりもずっと大きくなると $\kappa^e=1$ となるが、この条件を仮定し $N \Delta A_x$ として分子のvan der Waals面積 $A_{vdW}$ を考える。分子サイズの空間を形成するエネルギーは、溶解パラメーターを用いて $V_{vdW} \delta_m^2$ 、表面張力を用いて $A_{vdW} \gamma$ となる。ステアリン酸メチルを溶質とした場合の値をTable 5-8に示した。なお、混合液体の表面張力はMacleod-Sugdenの相関、Tamuraの方法によって計算した<sup>23-25</sup>。

極性溶媒では、 $A_{vdW} \gamma < V_{vdW} \delta_m^2$ となることが分かる。

以上のように、極性液体では分子の配列のエントロピー変化が重要となる。しかし、溶解パラメーターの導入によって、移動相の保持への寄与を明確にすることができる。式5-17で移動相に関する項として $-2v_1 \delta_1 \delta_m$ と $v_1 \delta_m^2$ の二種類があるが、前者は溶質と溶媒分子間の相互作用に関し、後者は移動相中に溶質サイズの空間を形成するのに要するエネルギーに関する。 $\delta_m$ が大きくなるに従って、溶媒中に空間を作るエネルギーの保持に寄与する割合が大きくなっていく。極性の移動相を用いる逆相LCでは、この項が大きくなる。一方、SFCでは一般に $\delta_1 > \delta_m$ であり、相互作用項の影響が大きくなる。

次に、溶解パラメーターを用いて選択性と移動相特性の関係について考察する。 $\alpha'_{CN}$ と $\alpha'_{DB}$ の溶解パラメーター依存性をFig. 5-15に示した。前節で示したように、二重結合の増大による体積、表面積の減少はメチレン基1個分より小さく、移動相中に空間を形成するエネルギーだけでは説明できない。移動相と溶質との相互作用がこの選択性に寄与していることが推察される。溶解パラメーターの概念はHansen

によって拡張されている。彼は、分子間相互作用を分散力、極性相互作用（双極子間相互作用）、水素結合相互作用の3つに分けて考えた<sup>17)</sup>。

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (5-21)$$

ここで、添え字のd、p、hはそれぞれ分散力、極性、水素結合性を意味する。異なる二分子間の混合の凝集圧力は、次式で表される。

$$\bar{v}A = (i\delta_d - j\delta_d)^2 + (i\delta_p - j\delta_p)^2 + (i\delta_h - j\delta_h)^2 \quad (5-22)$$

Table 5-8にC O<sub>2</sub>、アセトニトリル、メタノールの各種溶解パラメーターを示した。

脂肪酸エステルの各溶解パラメーターはTable 5-6に示したグループ寄与の和によって求めた。

$$\delta_p = \sum_i zF_p / V \quad (5-23)$$

$$\delta_h = \left( - \sum_i zU_h / V \right)^{1/2} \quad (5-24)$$

$$\delta_d = (\delta^2 - \delta_p^2 - \delta_h^2)^{1/2} \quad (5-25)$$

C<sub>17:0</sub>、C<sub>18:0</sub>、C<sub>18:1</sub>のメチルエステルの各溶解パラメーターをTable 5-9に示した。さらに、各移動相における、 $v_1(-2^i\delta_d^j\delta_d + j\delta_d^2)$ 、 $v_1(-2^i\delta_p^j\delta_p + j\delta_p^2)$ 、 $v_1(-2^i\delta_h^j\delta_h + j\delta_h^2)$ の値をTable 5-10に示した。これらの値は、移動相の各特性が溶質の保持に与える影響をエネルギーの次元で表している。なお、 $v_1$ はTable 5-7から計算した値を用いた。アセトニトリルでは、C<sub>17:0</sub>とC<sub>18:0</sub>のエネルギーの違いには分散力項、極性項があるが、C<sub>18:0</sub>とC<sub>18:1</sub>のエネルギー差は極性項によるものである。二重結合による極性溶解パラメーターの変化は0.3 MPa<sup>1/2</sup>程度と小さいが、溶媒の $\delta_p$ が大きいため相互作用のエネルギー差 $-2v_1^j\delta_p^i\delta_p$ は大きくなる。またメタノールの場合は $\delta_h$ が大きくなるため、水素結合項も選択性に関与する。上記の分散力、極性、水素結合性に関するエネルギーの和をTable 5-10に合わせて示した。C<sub>17:0</sub>とC<sub>18:1</sub>の差をアセトニトリルとメタノールで比較すると、アセトニトリルが大きい値となる。これは、炭素数に対する選択性を基準として考えた場合、不飽和度に対する選択性がアセトニトリルで大きくなることを意味している。実際、アセトニトリルでは $\alpha'_{DB}/\alpha'_{CN}=1.24$ であるが、メタノールでは $\alpha'_{DB}/\alpha'_{CN}=1.12$ である。一方C O<sub>2</sub>は無極性のため、選択性は分散力項の差にのみ依存する。不飽和度の違いによる $v_1(-2^i\delta_d^j\delta_d + j\delta_d^2)$ の差は小さいため、C



$O_2$ を移動相とするSFCでの $\alpha'_{DB}$ の値は、逆相LCの場合よりも小さくなる。ただし、配向によるエントロピー変化のために、自由エネルギーの値は溶解パラメーターで記述される内部エネルギーの値より（絶対値として）小さくなるものと考えられ、液体溶媒と $CO_2$ の移動相としての定量的な比較は難しい。しかし、定性的には、Hansenの溶解パラメーターを用いることにより両者の移動相としての違いを論じることができる。

#### 5-4 結言

SFCを用いて、脂肪酸メチルエステルの分離を行った。その結果として以下の知見を得た。

- 1) 脂肪酸メチルエステルのSFCにおける保持は、その炭素数CNと二重結合数DBに依存する。保持比の対数と炭素数の間には傾きが正の直線関係があり、一方二重結合数との間には傾きが負の直線関係がある。 $\ln k'$  vs. CNプロットの傾きは二重結合数に、 $\ln k'$  vs. DBプロットの傾きは炭素数に依存する。(Table 5-2, Figs. 5-1, 5-2)
- 2) 313 Kで、8.8, 13.7 MPaの条件では、 $\ln k'$  vs. CNの傾きと $\ln k'$  vs. DBの傾きの比はおおよそ2/3に近くなり、エステルは $PN_{SFC} = CN - (2/3)DB$ の順に溶出する傾向が見られた。この傾きの比は温度、圧力、モディファイアー添加によって変化するため、これらの分離条件を調節することで、重なって溶出する成分を分離することができる。(Tables 5-2, 5-3, Figs. 5-3, 5-4, 5-5)
- 3) モルティエラ属糸状菌由来のエステル混合物中に $\gamma$ -リノレン酸が6.1 wt%含まれているが、SFCを用いて分取を試みたところ回収率100%で濃度99 wt%まで濃縮できた。この時、温度、圧力の設定が重要であった。(Table 5-4, Fig. 5-7, 5-8)
- 4) 保持比の移動相密度依存性を調べたところ、保持比の対数と密度の対数の間に直線関係が見られた。これは、超臨界流体へのエステルの溶解度の対数が流体密度の対数に対して直線的になり(Chrastilの式)、保持比の対数と溶質溶解度の対数の間に直線関係がある(Bartleの式)時に成立する。より厳密な保持と密度の関係はMartireによって与えられており、保持比の対数は密度の二次関数となり、高密度域での保持の上昇が予測されている。Martireの式の導出では格子流体モデルが用いられており、溶媒間の相互作用が考慮されている。(Figs. 5-11, 5-12, Table 5-6)
- 5) エステルの炭素数に対する選択性 $\alpha'_{CN}$ と二重結合数に対する選択性 $\alpha'_{DB}$ は、移動相密度に依存して変化する。本実験の密度範囲( $0.6 \text{ g/cm}^3 < \rho < 0.9 \text{ g/cm}^3$ )では、 $\alpha'_{CN}$ は密度の増大によって低下し、 $\alpha'_{DB}$ は上昇する。この依存性はMartireの式によって説明できる。 $\alpha'_{CN}$ は溶質のサイズに関する選択性であり、 $\alpha'_{DB}$ は溶質溶媒間相

相互作用に基づく選択性と言える。(Fig. 5-13)

6) 逆相LCでも、保持比の対数とエステルの炭素数の間に直線関係が見られた。その傾きは移動相の種類、組成に依存した。しかし、 $\ln k'$  vs. DBプロットはSFCのように直線にはならない。一般に二重結合数が0→1の時の保持比の対数の低下は、1→2の時の保持比の対数の低下よりも大きい。また、逆相LCでは、二重結合に対する選択性は、SFCの場合よりも大きくなる。例えば、 $C_{18:0}$ と $C_{18:1}$ の選択性は炭素数1.6-2.0に相当し、 $PN_{LC} = CN - (1.6 \sim 2.0)DB$ となる。(Table 5-5, Fig. 5-9, 5-10)

7) LCにおける保持とSFCにおける保持を比較するため、溶解パラメーターの概念を用いた。SFCでは、移動相の溶解パラメーターが溶質の溶解パラメーターより小さいところで通常操作され、その範囲では溶質溶媒間相互作用が重要である。逆相LCでは、一般に移動相の溶解パラメーターは溶質の溶解パラメーターよりも大きい。溶媒の溶解パラメーターが溶質の溶解パラメーターよりも大きくなるに従い、溶媒-溶媒間相互作用が保持に重要な働きをする。ただし、極性な液体では、配向によるエントロピー効果があるため、溶解パラメーターはSFCとLCの保持を定量的に扱うことはできない。(Table 5-8, Fig. 5-14)

8) 二重結合数に対する選択性は、逆相LCの方がSFCよりも大きい。 $CO_2$ は非極性であり、溶質との相互作用は分散力だけのため、二重結合による溶質の極性の差に対して選択性をほとんど示さない。一方、極性液体はその極性相互作用または水素結合性相互作用のために、二重結合による溶質の僅かな極性の違いを捉え、高い選択性を示す。(Table 5-9, Fig. 5-15)

## REFERENCES

- 1) Taniguchi, T., Tsuji, T., Shibata, M., Kobayashi, T., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2367 (1985).
- 2) Ikushima, Y., Hatakeda, K., Saito, N., Ito, S., Goto, T., *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **15**, 511 (1989).
- 3) Suzuki, Y., Konno, M., *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **15**, 439 (1989).
- 4) Nilsson, W. B., Gauglitz Jr., E. J., Hudson, J. K., Stout, V. F., Spinelli, J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 109 (1988).
- 5) Nilsson, W. B., Gauglitz Jr., E. J., Hudson, J. K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 1596 (1988).
- 6) Kubota, M., Matsuzaki, H., Takahashi, S., Inoue, S., *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **15**, 446 (1989).
- 7) Martire, D. E., Boehm, R. E., *J. Phys. Chem.*, **91**, 2433 (1987).
- 8) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1569 (1987).
- 9) Bondi, A., "Physical Properties of Molecular Crystals, Liquid, and Gases", Wiley, New York (1968).
- 10) Warthen, J. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 151 (1975).
- 11) Murui, T., Watanabe, H., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **28**, 461 (1979).
- 12) Chrastil, J., *J. Phys. Chem.*, **86**, 3016 (1982).
- 13) Bartle, K. D., Clifford, A. A., Jafar, S. A., Kithinji, J. P., Shilstone, D. F., *J. Chromatogr.*, **517**, 459 (1990).
- 14) Bartle, K. D., Clifford, A. A., Jafar, S. A., *J. Chem. Eng. Data*, **35**, 355 (1990).
- 15) Schoenmakers, P. J., *J. Chromatogr.*, **315**, 1 (1984).
- 16) Crubry, J. J., Myers, M. N., Giddings, J. C., *J. Phys. Chem.*, **74**, 4260 (1970).
- 17) Barton, A. F. M., "CRC handbook of solubility parameters and other cohesion parameters", CRC Press, Boca Raton, Florida (1983).
- 18) Allada, S. R., *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **23**, 344 (1984).
- 19) Johnston, K. P., McFann, G. J., Peck, D. G., Lemert, R. M., *Fluid Phase Equilibria*, **52**, 337 (1989).
- 20) Eckert, C. A., Ziger, D. H., Johnston, K. P., Ellison, T. K., *Fluid Phase Equilibria*, **14**, 167 (1983).
- 21) Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
- 22) Horvath, C., Melander, W., *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 393 (1977).
- 23) Reid, R. C., Prausnitz, J. M., Sherwood, T. K., "The properties of gases and liquids", 3rd

ed., McGraw-Hill (1977).

24) Quale, O. R., *Chem. Rev.*, **53**, 439 (1953).

25) Tamura, M., Kurata, M., Odami, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **28**, 83 (1955).

Table 5-1 Fatty acid composition of the ester mixture used in this experiment.

Sample	Fatty acid ( wt% of total )						
	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
ester mixture <sup>a)</sup>	0.6	30.0	1.4	4.3	49.5	8.1	6.1

a) This sample was derived from fungi oil (*Mortierella ramanniana*).

Table 5-2 Increments of log  $k'$  for one methylene group and decrements of log  $k'$  for one double bond observed in SFC separation of fatty acid methyl esters. Column Suprapak Sil C<sub>18</sub>, Temperature 313 K, mobile phase CO<sub>2</sub>. See the text for other SFC conditions.

Outlet pressure MPa	Increments of log $k'$ for one methylene groupe		Decrements of log $k'$ for one double bond	
	DB=0 <sup>a)</sup>	DB=1 <sup>a)</sup>	CN=18 <sup>b)</sup>	CN=20 <sup>b)</sup>
8.8	0.093	0.084	0.060	0.047
13.7	0.082	0.074	0.063	0.052

a) The number of double bonds of fatty acids.

b) Carbon number of fatty acids.

Table 5-3 Increments of log  $k'$  for one methylene group and decrements of log  $k'$  for one double bond observed in SFC separation of fatty acid methyl esters. Column Suprapak Sil C<sub>18</sub>. See the text for SFC conditions.

Mobile phase	Temp. K	Pressure MPa	Increments of log $k'$ for one methylene group		Decrements of log $k'$ for one double bond	
			DB=0 <sup>a)</sup>	DB=1 <sup>a)</sup>	CN=18 <sup>b)</sup>	CN=20 <sup>b)</sup>
CO <sub>2</sub>	308	8.8	0.087	0.083	0.065	0.053
		13.7	0.083	0.075	0.069	0.057
CO <sub>2</sub> +MeOH (10 wt%)	313	9.8	0.077	0.069	0.061	0.052
		13.7	0.077	0.065	0.069	0.058

<sup>a)</sup> The number of double bonds of fatty acids.

<sup>b)</sup> Carbon number of fatty acids.

Table 5-4 Fatty acid composition of the lipids fractionated by SFC.

Temp. (K)	Pressure (MPa)	Fatty acid (wt% of total)					Recovery (%)
		C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	
308	9.8	0.1	0.6	0.3	-	99.0	100
308	11.8 <sup>a)</sup>	0.1	2.7	0.3	0.1	96.8	96.2
308	11.8 <sup>a)</sup>	-	1.6	0.2	-	98.2	91.2

<sup>a)</sup> Different in fraction time.

Table 5-5 Capacity factors of methyl stearate and increments of  $\log k'$  for one carbon number and decrements of  $\log k'$  for one double bond in HPLC separation of fatty acid methyl esters. Column MTHV, temperature 303 K.

mobile phase	$k'_{C18:0}$	Increments of $\log k'$ for one methylene groupe		Decrements of $\log k'$ for one double bond	
		DB=0 <sup>a)</sup>	C18:0/C18:1 <sup>b)</sup>	C18:1/C18:2 <sup>c)</sup>	
CH <sub>3</sub> CN	5.31	0.105	0.211	0.182	
CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH(1:1)	3.68	0.100	0.196	0.173	
CH <sub>3</sub> OH	2.48	0.088	0.146	0.128	
CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O(95:5)	6.96	0.104	0.175	0.137	
CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O(90:10)	19.3	0.133	0.215	0.170	

a) C14:0, C16:0 and C18:0 were used.

b)  $\log k'_{C18:0} - \log k'_{C18:1}$ .

c)  $\log k'_{C18:1} - \log k'_{C18:2}$ .

Table 5-6 Parameters in eqs. 5-2, 5-3 and 5-4 for methyl stearate/C<sub>18</sub>/CO<sub>2</sub> system. Temperature is 313 K.

$V^*_{C18:0}$ <sup>a)</sup> (cm <sup>3</sup> /mol)	$V^*_{CO_2}$ <sup>a)</sup> (cm <sup>3</sup> /mol)	$r_{C18:0}/r_{CO_2}$ <sup>b)</sup>	$r_{CO_2}$ <sup>c)</sup>	$\ln k'_0$	$\epsilon_{ab}/\epsilon_{bbd}$	$\rho_{\min}$ (g/cm <sup>3</sup> )
206.2	19.7	10.5	4.61	20.22	0.962	0.93

a)  $V^*$ : van der Waals volume <sup>9)</sup>.

b)  $V^*$  is proportional to  $r_i$ .

c) See reference 3.

d) a: methyl stearate, b: CO<sub>2</sub>

Table 5-7 Group contributions to the molar volume and molar vaporization energy <sup>17)</sup>.

group	$z_V$ (cm <sup>3</sup> /mol)	$z_F$ (J <sup>1/2</sup> cm <sup>3/2</sup> /mol)	$z_{F_p}^a)$ (J <sup>1/2</sup> cm <sup>3/2</sup> /mol)	$z_{U_h}^b)$ (J/mol)
-CH <sub>3</sub>	33.5	303.4	0	0
-CH <sub>2</sub> -	16.1	269.0	0	0
=CH-	13.5	248.5	59.5	0
-COO-	18.0	668.1	524.1	7000
cis		-14.6	-14.5	

a) Polar group molar attractive contribution.

b) Hydrogen bonding parameter group contribution.



Table 5-8 Solubility parameters and surface tensions of supercritical CO<sub>2</sub> at various densities, CH<sub>3</sub>CN-CH<sub>3</sub>OH and CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O systems, and capacity factors of methyl stearate in SFC and LC. Two types of energy of creating a solute-size cavity in the mobile phase are also described.

mobile phase	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\delta_m$ <sup>a)</sup> (MPa <sup>1/2</sup> )	$\gamma_m$ <sup>b)</sup> (dyn/cm)	$k'_{C18:0}$	$k' \rho/M$ <sup>c)</sup> (mol/cm <sup>3</sup> )	$V^+ \delta_m^2$ <sup>d)</sup> (kJ)	$A^+ \gamma_m$ <sup>d)</sup> (kJ)
CO <sub>2</sub> <sup>e)</sup>	0.646	12.8		5.926	0.0870	34	
	0.719	14.1		3.285	0.0537	41	
	0.762	14.7		2.411	0.0418	44	
	0.806	15.2		1.751	0.0321	47	
	0.838	15.5		1.407	0.0267	49	
	0.871	15.7		1.170	0.0232	51	
	0.900	15.9		1.008	0.0206	52	
CH <sub>3</sub> CN <sup>f)</sup>	0.78	24.2	28.0	5.307	0.101	120	79
CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH (1:1) <sup>g)</sup>	0.78	25.4	23.1	3.678	0.0798	133	65
CH <sub>3</sub> OH <sup>f)</sup>	0.78	26.4	21.7	2.482	0.0605	144	61
CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (95:5) <sup>g)</sup>	0.80	27.5	22.1	6.958	0.1823	155	62
CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (90:10) <sup>g)</sup>	0.82	28.5	22.4	19.33	0.5427	167	63

a) For mixture,  $\delta_m = \phi_1 \delta_1 + \phi_2 \delta_2$ ,  $\phi_i$ : volume fraction.

b) Correlation of Macleod-Sugden was used in calculation of surface tension of mixtures<sup>23-25</sup>.

c) For mixture,  $1/M = 1(x_1/M_1 + x_2/M_2)$ ,  $x_i$ : mass fraction.

d)  $V^+$ : van der Waals volume, 206.2 cm<sup>3</sup>/mol for methyl stearate<sup>9</sup>).  $A^+$ : van der Waals surface area,  $28.04 \times 10^9$  cm<sup>2</sup>/mol for methyl stearate<sup>9</sup>).

e) 313 K.

f) 303 K.

g) Volume ratio. 303 K.

Table 5-9 Hildebrand and Hansen parameters of supercritical CO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>OH and fatty acid methyl esters.

solvent	$\delta$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_d$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_p$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_h$ (MPa <sup>1/2</sup> )
CO <sub>2</sub> ( $\rho=0.646$ g/cm <sup>3</sup> ) <sup>a)</sup>	12.8	12.8	0	0
CO <sub>2</sub> ( $\rho=0.900$ g/cm <sup>3</sup> ) <sup>a)</sup>	15.9	15.9	0	0
CH <sub>3</sub> CN <sup>b)</sup>	24.4	15.3	18.0	6.1
CH <sub>3</sub> OH <sup>b)</sup>	29.6	15.1	12.3	22.3
C <sub>17:0</sub> methyl ester <sup>c)</sup>	17.1	16.4	1.61	4.52
C <sub>18:0</sub> methyl ester <sup>c)</sup>	17.1	16.4	1.53	4.63
C <sub>18:1</sub> methyl ester <sup>c)</sup>	17.2	16.5	1.86	4.55

a) 313 K. Reference 18.

b) 303 K. Reference 17.

c) 298 K. See the text and reference 17 for the estimation of these parameters of fatty acid methyl esters.

Table 5-10 Values of  $v_1(-2^i\delta_d^j\delta_d+i\delta_d^2)$ ,  $v_1(-2^i\delta_p^j\delta_p+i\delta_p^2)$  and  $v_1(-2^i\delta_h^j\delta_h+i\delta_h^2)$  of fatty acid methyl esters/(supercritical CO<sub>2</sub> or CH<sub>3</sub>CN or CH<sub>3</sub>OH) systems.

solvent	solute a)	$v_1(-2^i\delta_d^j\delta_d+i\delta_d^2)$ (kJ)	$v_1(-2^i\delta_p^j\delta_p+i\delta_p^2)$ (kJ)	$v_1(-2^i\delta_h^j\delta_h+i\delta_h^2)$ (kJ)	total (kJ)
CO <sub>2</sub> (313 K, 0.646 g/cm <sup>3</sup> )	C <sub>17:0</sub> methyl ester	-83.5	0	0	-83.5
	C <sub>18:0</sub> methyl ester	-87.8	0	0	-87.8
	C <sub>18:1</sub> methyl ester	-87.0	0	0	-87.0
CO <sub>2</sub> (313 K, 0.900 g/cm <sup>3</sup> )	C <sub>17:0</sub> methyl ester	-93.2	0	0	-93.2
	C <sub>18:0</sub> methyl ester	-92.2	0	0	-92.2
	C <sub>18:1</sub> methyl ester	-91.4	0	0	-91.4
CH <sub>3</sub> CN (303 K)	C <sub>17:0</sub> methyl ester	-87.3	86.9	-6.3	-6.7
	C <sub>18:0</sub> methyl ester	-91.8	92.1	-6.1	-5.8
	C <sub>18:1</sub> methyl ester	-91.1	86.7	-6.2	-10.6
CH <sub>3</sub> OH (303 K)	C <sub>17:0</sub> methyl ester	-87.2	36.5	94.9	44.2
	C <sub>18:0</sub> methyl ester	-91.7	38.9	101.3	48.5
	C <sub>18:1</sub> methyl ester	-90.9	35.6	99.3	44.0

a) Molar volumes of C<sub>17:0</sub>, C<sub>18:0</sub> and C<sub>18:1</sub> methyl esters are 326.5, 342.6 and 337.4 cm<sup>3</sup>/mol, respectively <sup>9)</sup>.

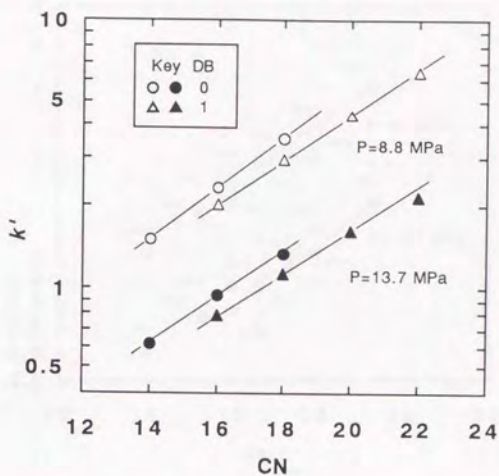


Fig. 5-1 Relationship between the capacity factor  $k'$  in SFC and carbon number of fatty acids. Column: Superpak Sil C<sub>18</sub>, temperature: 313 K.

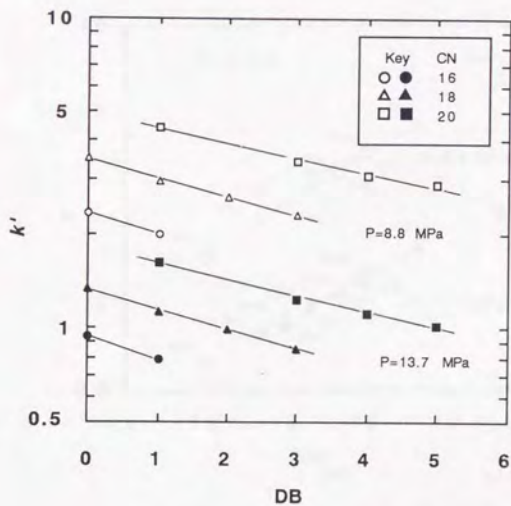


Fig. 5-2 Relationship between the capacity factor  $k'$  and the number of double bonds of fatty acids. Column: Superpak Sil C<sub>18</sub>, temperature: 313 K.

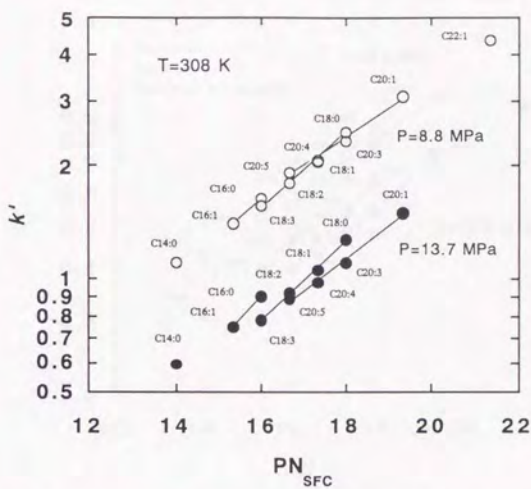


Fig. 5-3 Relationship between the capacity factor  $k'$  and  $PN_{SFC}$  ( $= CN - (2/3)DB$ ) at 308 K. Column: Superpak Sil C<sub>18</sub>.

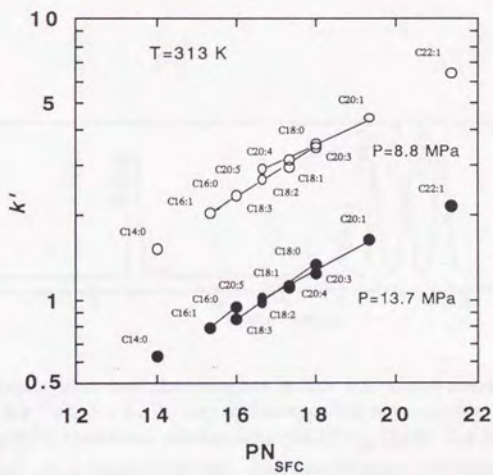


Fig. 5-4 Relationship between the capacity factor  $k'$  and  $PN_{SFC}$  ( $= CN - (2/3)DB$ ) at 313 K. Column: Superpak Sil C<sub>18</sub>.

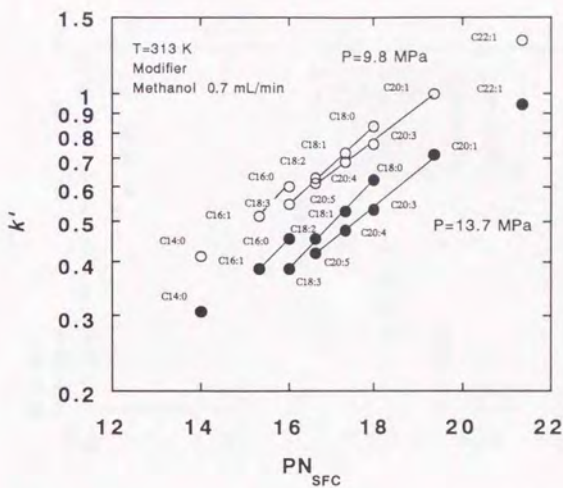


Fig. 5-5 Effect of addition of methanol on capacity factor  $k'$  at 313 K. Column: Superpak Sil  $C_{18}$ .

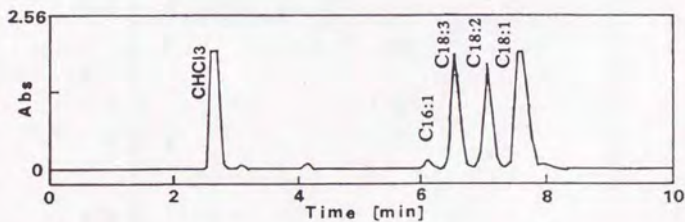


Fig. 5-6 Supercritical fluid chromatogram of fatty acid methyl esters derived from fungi oil. See Table 5-1 for the fatty acid composition of the sample.

Chromatographic conditions, column: Superpak Sil  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 10\text{ mm}$

I. D.), mobile phase: supercritical  $\text{CO}_2$ , flow rate 5.4 g/min, temperature:

313 K, pressure: 10 MPa, detector: UV detector (wavelength 195-350 nm).

$C_{16:1}$  Methyl palmitoleate       $C_{18:1}$  Methyl oleate

$C_{18:2}$  Methyl linoleate       $C_{18:3}$  Methyl linolenate

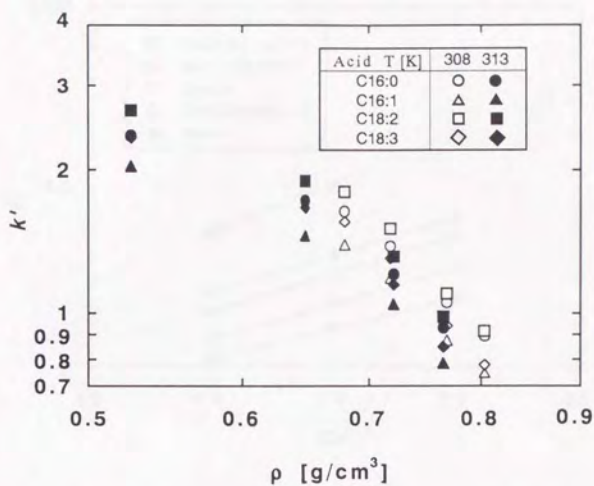


Fig. 5-7 Log-log plot of the capacity factor  $k'$  in SFC against the mobile phase density  $\rho$ .

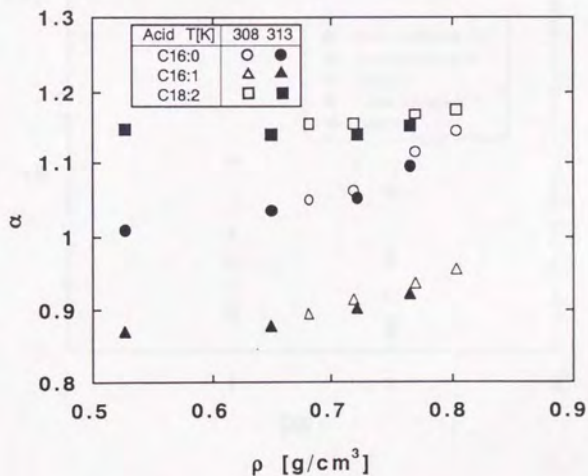


Fig. 5-8 Effect of the mobile phase density on selectivity  $\alpha$ .  $\alpha$  is defined by  $(k' \text{ of each ester}) / (k' \text{ of } \gamma\text{-methyl linolenate})$ .

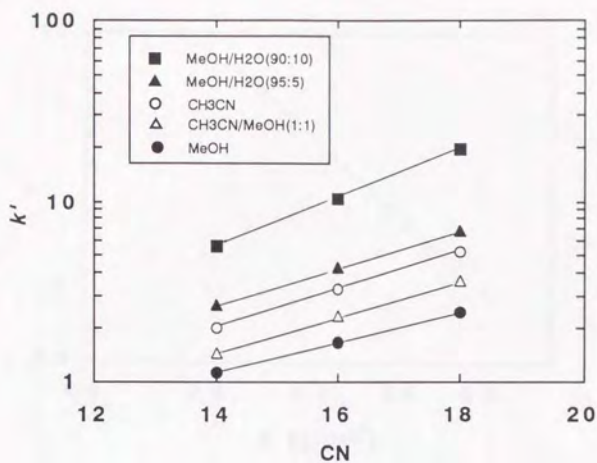


Fig. 5-9 Relationship between capacity factor  $k'$  in LC and carbon number of fatty acids. Column: MTHV, temperature: 303 K.

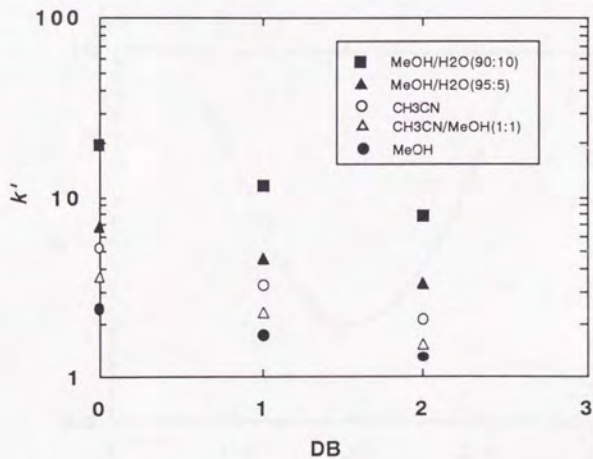


Fig. 5-10 Relationship between capacity factor  $k'$  in LC and the number of double bonds of fatty acids. Column: MTHV, temperature: 303 K.



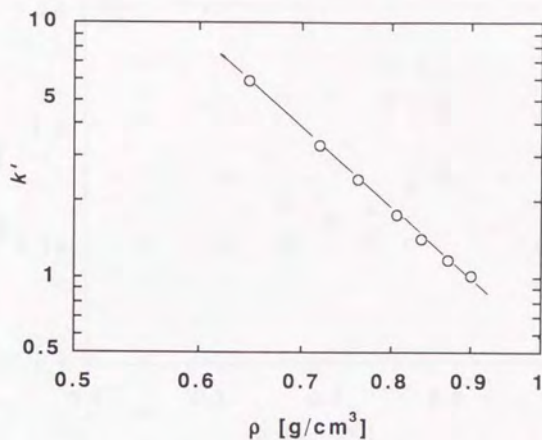


Fig. 5-11 Log-log plot of capacity factor of methyl stearate in SFC against mobile phase density. Column: MTHV, mobile phase: CO<sub>2</sub>, temperature: 313 K. The line was calculated with eq. 5-9.

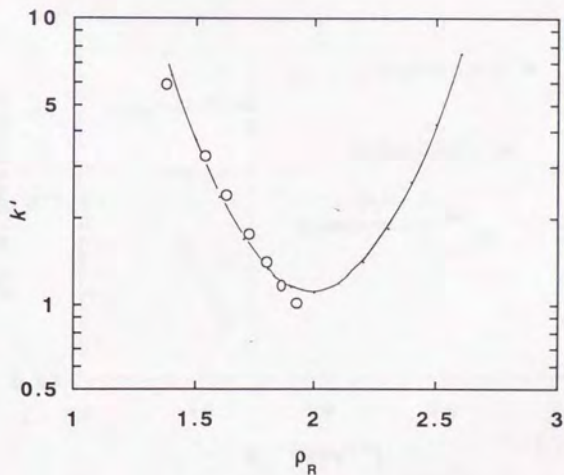


Fig. 5-12 Semilog plot of capacity factor of methyl stearate in SFC against mobile phase density. Column: MTHV, mobile phase: CO<sub>2</sub>, temperature: 313 K. The line was calculated with eq. 5-10.

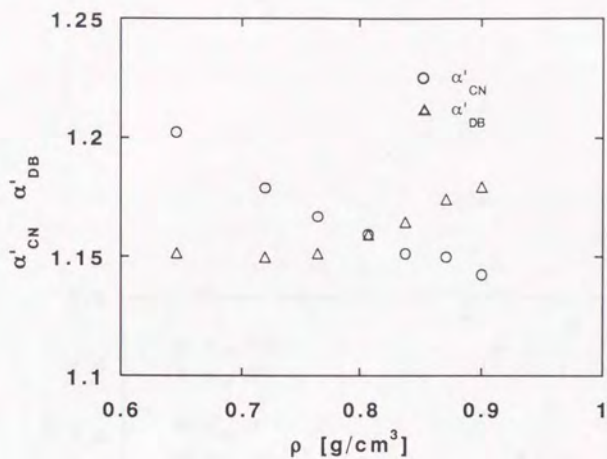


Fig. 5-13 Effect of the mobile phase density on  $\alpha'_{CN}$  and  $\alpha'_{DB}$ . The definition of  $\alpha'_{CN}$  and  $\alpha'_{DB}$  are described in the text. Column: MTHV, mobile phase:  $\text{CO}_2$ , temperature: 313 K.

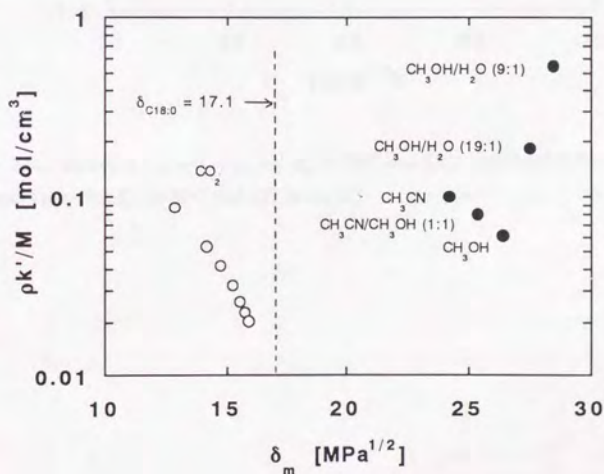


Fig. 5-14 Semilog plot of  $\rho k'/M$  against  $\delta_m$ . Column: MTHV, temperature: 313 K for SFC and 303 K for LC.

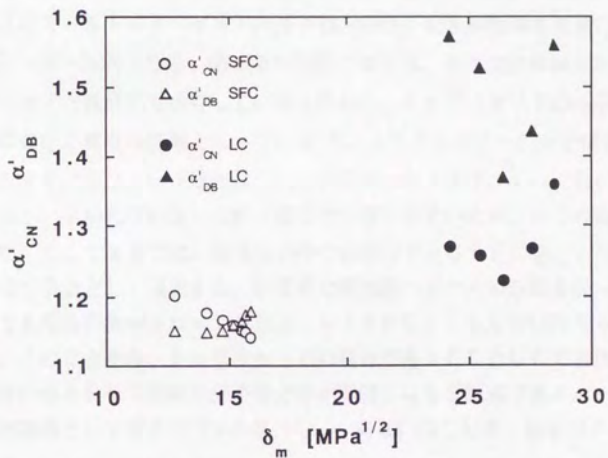


Fig. 5-15 Plot of  $\alpha'_{CN}$  and  $\alpha'_{DB}$  vs.  $\delta_m$  in SFC and LC. Column: MTHV, temperature: 313 K for SFC and 303 K for LC.

## 第六章

### オクタデシル基結合シリカゲルを固定相とするSFCによるトリグリセリドの分離

#### 6-1 緒言

トリグリセリドは、グリセリンに脂肪酸が3個エステル結合した構造を持ち、植物油、バター等の天然油脂の主成分である。通常、天然油脂は多種類の脂肪酸で構成されているため、そのトリグリセリドは多くの分子種から成る。例えば、 $n$ 種の脂肪酸で構成されているトリグリセリドの分子種の数、位置異性体を考慮に入れない場合でも $(n^3+3n^2+2n)/6$ となる。融点等の脂質の物性は、その脂肪酸組成だけではなくトリグリセリド組成にも依存していると言われ、トリグリセリドの分子種分析は脂質化学における重要な課題となっている<sup>1,2)</sup>。トリグリセリドの分子種分析には逆相液体クロマトグラフィー（逆相LC）、ガスクロマトグラフィー（GC）が利用されているが、不飽和度の高い試料は高温で分解しやすいため、GCの使用には限界があった。そこで本章では、温和な条件で分析のできるSFCを、トリグリセリドの分離分析手法として適用する。第五章で脂肪酸エステルの分離を扱ったが、同じ充填剤でも超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）とLCでは異なる溶出挙動を示した。このことから、トリグリセリドの場合でもSFCとLCで溶出挙動が異なり、両者の組み合わせで詳細な分子種分析が可能になると推測できる。

SFCの充填剤としてオクタデシル基（ $C_{18}$ 、あるいはODS）結合シリカゲルを用いる。 $C_{18}$ 結合シリカゲルは逆相LCのカラム充填剤として広く用いられており、様々な種類の充填剤が市販され入手が容易である。本研究の第一の目的は、 $C_{18}$ 結合シリカゲルを充填剤とするSFCとLCにおいて、トリグリセリドの分離挙動を調べ、両者の違いを比較、考察することである。

SFCにおいて、 $C_{18}$ 結合充填剤は多環芳香族、ポリマー添加物、カロテン類、ポリスチレン、各種有機化合物、ステロイド、天然油脂の分離に用いられている<sup>3-16)</sup>。しかし、 $C_{18}$ 結合充填剤のSFCへの適用例はHPLCと較べて少ない。これはSFCの歴史が短いこと他に、SFC分離に適する $C_{18}$ 結合充填剤の開発が十分に進んでいないことも理由の一つである。SFCにおける分離挙動はLCの場合よりも固定相の特性に敏感であることが報告されており、特に $C_{18}$ 結合充填剤の支持体の不活性化度が最もSFCの分離挙動に影響を及ぼすと指摘されている<sup>4,14,17-20)</sup>。

即ち、SFCではLC以上に厳密な不活性化処理、固定相特性（結合基量、細孔径等）の制御が要求される。そこで、本研究の第二の目的は、SFCによるトリグリセリドの分離において重要となるC<sub>18</sub>結合シリカの充填剤特性を把握することとし、モディファイアーを添加することなく分離が可能な充填剤の開発と、トリグリセリドの分離条件の探索を行う。

## 6-2 実験

### 6-2-1 糸状菌脂質の分離

糸状菌の *Mortierella ramanniana* (IFO8187) によって生産された中性脂質を試料として用いた。その脂肪酸組成をTable 6-1に示した。SFC装置としてSUPER-100（日本分光製、Fig. 1-3参照）を装置として用い、マルチUV検出器（日本分光製、195-350 nm）でトリグリセリドの吸光度を測定した。カラムにはSuprapak Sil C18（モノメリックタイプ、粒径5 μm, 250 x 10 mm I. D., 日本分光製）を用いた。温度313 K、圧力13.7 MPa、CO<sub>2</sub>流速約5.4 g/minの条件で分離し、モディファイアーとしてヘキサン、メタノールを使用した。なお、菌体の培養法、脂肪酸の分析法は第二章に詳述した。また、標準トリグリセリドとしてトリミリスチン(TM, MMM)、トリパルミチン(TP, PPP)、トリステアリン(TS, SSS)、トリパルミトレイン(TPo, PoPoPo)、トリオレイン(TO, OOO)、トリリノレイン(TL, LLL)、トリリノレニン(TLn, LnLnLn)を用いた。それらのアシル基の総炭素数、二重結合数をTable 6-2に示した。

### 6-2-2 市販C<sub>18</sub>結合シリカゲルにおけるトリグリセリドの分離挙動

市販のC<sub>18</sub>結合シリカゲルを用いてトリグリセリドの分離挙動を調べ、SFCとLCの比較を行った。用いた充填剤のメーカー、カタログデータをTable 6-3に示した。表の全ての充填剤はエンドキャッピング（不活性化処理）済みのものである。トリグリセリドとしてTP、TS、TO、TL、1,2-distearoyl-3-oleoyl-glycerol (SSO)、1,2-dioleoyl-3-stearoyl-glycerol (OOS)を用いた。LCによる分離は温度303 Kで行い、溶離液としてアセトン/アセトニトリル(4:1)を用いた。流速は1.0 mL/minとし、トリグリセリドの検出にはRI検出器(RI-3H, 日本分析製)を用いた。SFCによる分離は温度313 Kで行い、出口圧力25 MPa、CO<sub>2</sub>流速約1.8 g/minに設定した。トリグリセリドの検出にはUV検出器(875-UV, 日本分光製)を用い、210 nmの吸光度を測定した。

### 6-2-3 オクタデシル基結合充填剤の調製と分離特性の測定

### 1) C<sub>18</sub>シランとシリカゲルの反応

オクタデシル基結合シリカゲルの合成は、既往の報告に従った<sup>21-24)</sup>。市販の高純度シリカゲル(粒径5 μm, 細孔径12 nm, S<sub>BET</sub>=354 m<sup>2</sup>/g)を393 Kで4時間以上真空乾燥した。乾燥シリカゲルをフラスコに移し、所定量のdimethyloctadecylchlorosilane (DMODCS)を溶かした1,1,2-trichloroethaneを加えた。溶媒は予めMolecular sieve 3A<sup>1/16</sup>で乾燥しておいた。さらに塩基を加え、約12時間攪拌しながら還流した。ゲルの結合密度は、仕込シラン濃度と塩基の種類によって調製した。本実験では三種類の塩基、ピリジン、モルホリン、イミダゾールをシリル化の触媒(生成する塩酸の受容体)として用いた。塩基とシランのモル比は、ピリジンとモルホリンの場合は1.5、イミダゾールの場合は2.0とした。反応後、ゲルをglass microfiberでろ過し、クロロホルム、アセトン、メタノールで洗浄し、393 Kで4時間以上真空乾燥した。乾燥ゲルの一部は元素分析に回し、残りはさらにエンドキャッピングした。

### 2) エンドキャッピング法

調製したC<sub>18</sub>結合シリカゲルは、様々な方法で不活性化処理(エンドキャッピング)した。まず、ゲルをtrimethylchlorosilane (TMCS)を溶かした1,1,2-trichloroethaneに加え、333 Kで3時間反応した。その反応の触媒として、そのゲルとDMODCSとの反応に用いた塩基を用いた。反応後、ゲルは上述のように洗浄し乾燥した。一次エンドキャッピングしたゲルの一部はカラムに充填し、SFC分離に使用した。残りはさらに3種の方法で二次エンドキャッピングを行った。(1) 上述条件で、再度TMCSでエンドキャッピング、(2) トルエン中でhexamethyldisilazane (HMDS)と60℃で3時間反応、(3) 気相のHMDSで573 Kで24時間反応<sup>25)</sup>、である。二次エンドキャッピングしたゲルは、同様に洗浄・乾燥し一部を元素分析に回した。この様に調製したゲルは150 × 4.6 mm I. D.のカラムにスラリー充填した。

### 3) SFCとLC

糸状菌の*Mortierella ramanniana*によって生産された脂質と市販のエゴマ油(日本油脂製)を試料として用いた。それらの脂肪酸組成をTable 6-1に示した。またトリグリセリドの標準サンプルとしてTM、TP、TS、TO、TL、SSO、OOS、1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol (POP)、1,3-dioleoyl-3-palmitoyl-glycerol (OPO)を用いた。これらのトリグリセリドのアシル基の全炭素数(CN)と全二重結合数(DB)をTable 6-2に示す。SFCの分離条件は、移動相CO<sub>2</sub>、温度303-323 K、圧力15-28 MPa、流速約1.8 g/minである。UV検出器(875-UV, 日本分光製)を用い、210 nmの吸光度を測定した。LCの操作条件は、移動相アセトン/アセトニトリル(4:1)、温度303 K、流速1.0 mL/minとした。検出にはRI検出器(RI-3H, 日本分析製)を用いた。

### 6-3 結果と考察

#### 6-3-1 SFCによる糸状菌中性脂質の分離

トリグリセリドやステロールエステルは分子量が大きく、脂肪酸エステルと比べると $\text{CO}_2$ への溶解度が小さい。そのため充填剤に強く保持され、分離に要する時間が長くなってしまふ。そこで分離の改良と分離時間短縮のため、ヘキサン、メタノールをモディファイアーとして移動相に添加した。モディファイアー添加の効果をFigs. 6-1, 6-2に示した。溶出時間の短縮が見られ、特にメタノールを添加した時には、ピーク間の分離の向上という効果が認められた。既往の研究によると、メタノールが分離の向上に有効であるのは、シリカ表面の残留シラノール基がメタノールでマスクされ吸着の影響が減少するためと言われている<sup>4,13,26</sup>。

Fig. 6-2に示されたトリグリセリドの各々のピークを分取し、その各画分の脂肪酸組成をTable 6-4に示す。分画されたトリグリセリドピークは必ずしも3種類内の脂肪酸で構成されているわけではなく、明らかに分子種の異なるトリグリセリドが混ざったものである。このことから、脂肪酸エステルの場合と同様に、トリグリセリドはその分子構造によって規則的に溶出していると考えられる。そこで、SFCにおいてトリグリセリドがどのような溶出挙動を表すのか調べるため、トリグリセリドピークと標準トリグリセリドの保持比 $k'$ をFig. 6-3にまとめて示した。横軸にはECN(equivalent carbon number)をとった。飽和トリグリセリドのECNはその定義からアシル基の総炭素数で表され、保持比の対数と直線関係になる。不飽和トリグリセリドおよびピークのECNは、飽和トリグリセリドに対して得られた $\log k'$  vs. ECNの直線上で、実際の保持比に対応する炭素数として求められる。ピークはECNが約1の間隔で分離されている。即ち炭素数にして1個分の間隔で溶出している。また、標準トリグリセリドにおいて、二重結合1個分のECNへの寄与は1前後である。逆相LCでのトリグリセリドの溶出順序は(総炭素数 $-2 \times$ 二重結合数)と報告されており<sup>27-29</sup>、二重結合数1個分の保持の変化は炭素数2個分に対応している。SFCでは二重結合に対する選択性が小さい。このことから、SFCとLCの組合せにより、トリグリセリドのより詳しい分子種分析が可能になると思われる。なお、トリグリセリドの溶出順序の詳細については後節で論じる。

#### 6-3-2 市販 $\text{C}_{18}$ 結合シリカゲルにおけるトリグリセリドの分離挙動

Table 6-3に示したカラムを用い、トリグリセリドの分離挙動をSFCおよびLCと比較した。トリオレインのSFCにおける保持比とLCにおける保持比をFig. 6-4

に示した。No.10, 12, 13の充填剤の場合、25 MPa, 313 K, 1.8 g/minのSFC条件では、トリグリセリドは30分以内には溶出しなかった。SFCとLCにおける保持には明確な相関は見られなかった。これは、SFCでは移動相が非極性のため、固定相に残留するシラノール基の吸着性が溶質の保持に影響したものと考えられる。実際、LCによる分離ではトリグリセリドはシャープなピークとして現れるが、SFCでは充填剤による違いが大きく、テーリングが生じる場合が多かった。L-column, Cosmosil C18, Inertsil ODS2, Wakosil 2-5C18における標準トリグリセリドのLC分離をFig. 6-5に、SFC分離をFig. 6-6に示す。SFCの分離挙動は、強く充填剤に依存していることが分かる。

さらに、トリオレインのピークから次式で求めた理論段高(HETP: height equivalent to theoretical plate)を、LCとSFCで比較した。その結果をTable 6-4に示す。

$$\text{HETP} = L/N \quad (6-1)$$

$$N = 5.54 \times (t_R/W_{1/2})^2 \quad (6-2)$$

ここでLはカラム長さ、Nは理論段数、 $t_R$ は保持時間、 $W_{1/2}$ は半値幅である。上式はピークが正規分布形の時の理論段高を与えるが、テーリングによるピーク幅の増大によってHETPは大きくなる。実験で用いた充填剤では、Supersil C18を除き、LCでのHETPは0.02~0.04 mmの範囲にあるが、SFCでは0.02~0.23まで変化している。Fig. 6-5, 6-6, Table 6-5より、充填剤の不活性化の程度がトリグリセリドの保持、カラム効率に大きく影響していると考えられる。従って、トリグリセリド分離において、SFC用の充填剤に要求される不活性化度は、LCの場合よりも厳しいものになる。

C<sub>18</sub>充填剤を用いたトリグリセリドのクロマト分離において、LCの分離挙動からはSFCの分離挙動は予測できず、SFC独自の評価が必要となる。その評価には充填剤の特性を把握する必要があるが、炭素含量等のカタログデータだけでは不十分であり、実際の結合基表面密度、不活性化度の定量的な位置付けが必要である。C<sub>18</sub>充填剤の定量的な評価のためには、ベースとして用いられるシリカゲルの種類および合成法が明確である必要がある。6-3-3節以降で、トリグリセリド分離のためのC<sub>18</sub>充填剤の評価について論じる。

### 6-3-3 調製C<sub>18</sub>結合ゲルの炭素含量と不活性化度

C<sub>18</sub>結合シリカゲルの調製条件と炭素含量をTable 6-6に示した。ゲルの最初の記号P、I、Mは、シリカゲルとDMODCSとの反応および1回目のTMCSによるエンドキャッピングで用いた塩基の種類を表し、それぞれピリジン、イミダゾール、モルフォリンを意味する。また、後の記号T、TT、THL、THVはそれぞれTMCSで



一回エンドキャッピング、TMCSで2回エンドキャッピング、TMCSで一次エンドキャッピングの後液相HMDSで2次エンドキャッピング、TMCSで一次エンドキャッピングの後気相HMDSで2次エンドキャッピングを意味する。イミダゾールが最も高い炭素含量を与える。液相のエンドキャッピングにより炭素含量は増大し、特に、 $C_{18}$ 基結合密度の小さいゲルほど炭素含量の増加率は大きくなる。一方、気相HMDSで573 Kで反応した場合、炭素含量は低下した。このC%の低下は、高温反応によるオクタデシル基のシリカ表面からの解離のためである。気相HMDSによる高い温度での反応は、 $C_{18}$ リガンドのシリカからの解離を促進するが、一方シリカ表面の不活性化度を増大させることが知られている<sup>25)</sup>。

$C_{18}$ 基結合ゲルの不活性化度は、ピリジンのような塩基性物質の保持を調べることによって評価できる。塩基性物質はシリカ表面に残留するシラノール基の吸着作用によって溶出の遅れ、テーリングを生じる<sup>17)</sup>。イミダゾールを塩基として合成したゲルIT, ITT, ITHL, ITHVのSFCにおけるフェノール、ピリジンの溶出挙動をFig. 6-7に示す。分離条件は温度313 K, 出口圧15 MPaである。液相でエンドキャッピングしたIT, ITT, ITHLのゲルでは、ピリジンの溶出の遅れおよび大きいテーリングが見られ、そのシリカ表面には未反応のシラノール基が残留していることが分かる。一方、気相のHMDSを用いて300°Cでエンドキャッピングしたゲルでは、ピリジンはテーリングを示すものの、フェノールとほぼ同じ位置に溶出した。高温でのエンドキャッピングはシリカ表面の不活性化に有効であることが分かる。各充填剤におけるフェノールの保持比と、フェノールとピリジンの選択性をTable 6-7に示す。塩基の種類にかかわらず、液相でのエンドキャッピングではピリジンの溶出は遅れる。また気相HMDSでエンドキャッピングしたゲルでは、フェノールの保持比は0.3以下になるが、液相でエンドキャッピングしたゲルでは0.87以上である。このように、高温でのエンドキャッピングによりシリカ表面を飛躍的に不活性化できる。

#### 6-3-4 調製 $C_{18}$ 結合シリカゲルにおけるトリグリセリドの分離挙動

##### 1) トリグリセリドの分離挙動

調製した各 $C_{18}$ 結合シリカゲルについて、SFCとLCにおけるトリグリセリドの分離効率を測定した。トリオレインのピークから式6-2によって計算した理論段高さHETPをTable 6-7に示した。本実験のSFCおよびLCの分離条件では、SFCの方がLCよりも小さいHETP値を示す。即ち高い理論段数が得られている。ただし、ピリジンを塩基として調製したPT, PTHLのゲルでは、SFCで分離した場合ピーク幅が大きくなり、HETPは低下した。これは、シリカ表面の残留シラノール基に

よる吸着の影響が出たものである。しかし、LC条件では、ピークの広がりによる理論段数の低下はSFCほど顕著ではなかった。これは、移動相として用いられた極性溶媒がシラノール基をマスクすることで、吸着の影響が減少したものと考えられる<sup>4)</sup>。

Table 6-6に示したピリジンの保持挙動から分かるように、モルホリン、イミダゾールを塩基として液相でエンドキャッピングしたゲルでも、シリカ表面にシラノール基が残留している。しかし、トリグリセリドの分離では吸着の影響によるピークの広がりには観察されなかった。これらのゲルとピリジンを用いてエンドキャッピングしたゲルとの違いは、シリカ表面の不活性化度の差に基づく。実際、ピリジンを触媒としてエンドキャッピングしたゲルよりも、モルホリン、イミダゾールを用いてエンドキャッピングしたゲルの方が、フェノールの保持は小さくなる。このことから、モルホリン、イミダゾールはピリジンよりもシリル化の触媒として優れていることが分かる。Buszewskiらによると、塩基はシランと中間体を形成し、それがシラノール基と反応する<sup>23)</sup>。また、フリーのシラノール基に塩基が結合しシリル化反応を阻害する働きもある。その平衡状態は塩基のpKa値に依存するため、結合基密度を最大にするような最適pKa値が存在し、彼らの結果では7~8の間にある<sup>23)</sup>。ピリジン、イミダゾール、モルホリンのpKa値はそれぞれ5.3、7.0、8.3であり、このような塩基のpKa値の違いがシリカ表面の不活性化度に影響したものと考えられる。

## 2) LCおよびSFCにおけるトリグリセリドの保持

調製した各C<sub>18</sub>結合ゲルにおけるトリステアリンの保持比を測定した。LCにおける保持比とゲルの炭素含量との関係をFig. 6-8に、SFCにおける保持比とゲルの炭素含量との関係をFig. 6-9に示した。LCにおいてトリステアリンの保持比は炭素含量が15 wt%まではC%の増大とともに増大し、15 wt%以上では減少した。SFCにおいても、ステアリンの保持比は炭素含量に対してLCと類似した傾向を示した。ただし炭素含量が14 wt%で保持比は最大となった。

近年、DorseyとDillは分配モデルを用いてRPLCの保持メカニズムを考察し、溶質の分配係数とC<sub>18</sub>結合密度の関係を調べている(第一章3節)<sup>30-32)</sup>。彼らは、ナフタレンの分配係数は、結合密度が3.1 μmol/m<sup>2</sup>以下の範囲で、結合密度に対して直線的に増大し、それ以上では低下することを示した(Fig. 1-6)。吸着モデルでは、この高結合密度での保持の低下は説明できず、彼らは逆相LCの保持メカニズムが分配モデルであると結論している。分配モデルでは、結合密度の増大による分配係数の低下は、固定相におけるコンホメーションのエントロピーの負の変化によって説明される。即ち、溶質が固定相に入ることによってC<sub>18</sub>のリガンドの配列化が生じるた

め、エネルギー的に不利になる。モノメリックC<sub>18</sub>結合充填剤の主な保持機構は、その移動相が超臨界流体であるか液体であるかにかかわらず、分配であることを示唆している。本実験で調製したゲルにおいて、エンドキャッピング試薬(TMCS, HMDS)由来の炭素を無視すれば、炭素含量15 wt%は約2.2 μmol/m<sup>2</sup>の結合基表面密度に相当する。即ち、トリステアリンの保持比は、ナフタレンよりも低いC<sub>18</sub>結合密度において最大になっている。

最大保持比を1として、Fig. 6-8, 6-9をFig. 6-10にまとめた。ただし、ピリジンを塩基としてエンドキャッピングしたPT1, PTHL1, PT2のゲルは除いた。SFCとLCの間に注目すべき違いが見られる。高結合密度域における保持比の低下の程度は、LCよりもSFCで大きい。固定相が移動相に影響されない単純な分配では、分配係数のC%依存性は同じカーブになる、即ち、LCとSFCにおける分配係数の比は、液体と超臨界流体間の溶質の分配係数として一定になるはずである( $K_{LC}/K_{SFC} = C_{sf}/C_{liq} = K_{sf/liq}$ )。しかし実際は、移動相溶媒は固定相中に溶解込み<sup>33)</sup>、また、充填剤表面に多分子層あるいは単分子層を形成している<sup>34-37)</sup>。Martireらによると、移動相の極性によって結合鎖の崩れ方(collapse)の程度に差が生じる<sup>33)</sup>。本実験の結果は、CO<sub>2</sub>と極性液体で固定相に与える影響が異なっていることを示している。ただし、SFCでは313 K、LCでは303 Kで測定されているため、温度も固定相の状態に影響したと考えられる。

塩基としてピリジンを用いて調製したゲルPT1, PTHL1, PT2はモルフォリンやイミダゾールを用いて調製したゲルよりも高い保持を与える。これらのゲルは十分にエンドキャッピングされておらず、シリカ表面に残留しているシラノール基の吸着作用のためにステアリンは強く充填剤に保持されたものである。

### 3) トリグリセリドの溶出順序

PTHV1ゲルにおける標準トリグリセリドの保持比を測定し、炭素数CNの関数としてFig. 6-11に、二重結合数DBの関数としてFig. 6-12に示した。Figs. 6-11, 6-12にはSFC、LCの両方の結果を示した。トリグリセリドの分離条件は、SFCの場合で温度313 K、出口圧力25 MPa、LCの場合で温度303 K、移動相アセトン/アセトニトリル(4:1)である。保持比の対数はCNに対して直線的に増加し、またDBの増大に対して直線的に減少した。ただし、トリリノレインの保持比は直線よりも上になる。なお、この直線関係は他の充填剤についても観察された。調製充填剤におけるlog *k'* vs. CN およびlog *k'* vs. DBの直線の傾きをTable 6-6にまとめて示した。またトリステアリンとトリリノレインの保持比から求めたlog *k'* vs. DBの傾きも合わせて示した。

炭素数1個の増大による $\log k'$ の増大分と、二重結合1個分の $\log k'$ の減少分を比較すると、SFCでは後者は前者の約1.0~1.2倍の範囲にある。ただし、ピリジンを塩基としてエンドキャッピングしたゲルPT1, PTHL1, PT2では、二重結合1個分の保持の低下は大きくなる。一方LCの場合、二重結合による $\log k'$ の低下分はSFCよりも大きく、炭素数1当たりの $\log k'$ の増加分の約2.3~2.6倍である。この傾きから、炭素数に対する選択性と、二重結合数に対する選択性を次式によって定義することにする。

$$\alpha'_{\text{CN}} = \exp[\text{slope of } \ln k' \text{ vs. CN}] \quad (6-3)$$

$$\alpha'_{\text{DB}} = \exp[-(\text{slope of } \ln k' \text{ vs. DB})] \quad (6-4)$$

LCにおける両選択性と充填剤炭素含量の関係をFig. 6-13に、SFCの場合をFig. 6-14に示した。逆相LCでは、15 wt%の炭素含量までは $\alpha'_{\text{CN}}$ はC%とともに増大するが、その値以上ではC%の増大によって減少する。一方、 $\alpha'_{\text{DB}}$ は炭素含量の増加とともに単調に増大した。SFCでは14 wt%の炭素含量までは $\alpha'_{\text{CN}}$ はC%とともに増大するが、その値以上ではC%の増大によって減少する。一方、 $\alpha'_{\text{DB}}$ は炭素含量の増加とともに増大するが、高い炭素含量域では減少する。ただし、その低下は $\alpha'_{\text{CN}}$ の場合よりも小さい。Fig. 6-14には示さなかったが、ピリジンを塩基としてエンドキャッピングしたゲルPT1, PTHL1, PT2では、他のゲルよりも高い $\alpha'_{\text{DB}}$ 値を示す。これは、残留シラノール基に由来する吸着性によって高い選択性となったものである。しかしLCでは、残留シラノール基の選択性への影響は見られなかった。これは、シリカ表面のシラノール基が極性溶媒によってマスクされ、溶質の保持に与える影響が減じられたためと考えられる。

$\alpha'_{\text{CN}}$ の炭素含量依存性は、Figs. 6-8, 6-9に示したトリステアリンの保持比の炭素含量依存性に類似している。この類似性は、Martireらの分配クロマトグラフィーの保持式を用いて説明できる<sup>38,39</sup>。移動相が単成分で、固定相中に浸透しないという単純な逆相LCにおいて、その溶質の分配係数は次式のように与えられる。

$$\ln K = r_a(r_a^{-1} - r_b^{-1}) + \frac{r_a z^2}{k_B T} \left[ (\epsilon_{ab} - \frac{\epsilon_{aa} + \epsilon_{bb}}{2}) - (\epsilon_{ad} - \frac{\epsilon_{aa} + \epsilon_{dd}}{2}) \right] \quad (6-5)$$

ここで、 $r_i$ は分子iのセグメント数、 $\epsilon_{ij}$ は分子iとjの間の近接セグメント間の相互作用エネルギー、 $z$ は各格子が近接する格子の数、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は温度、添字のa, b, dはそれぞれ溶質、溶媒、固定相を示す。移動相が同一ならば、式6-5は $\ln K = r_a f(r_b, r_d, \epsilon_{ab}, \epsilon_{ad}, T)$ と表さる。同族体の場合は、 $\epsilon_{ab}, \epsilon_{ad}$ が一定で $r_a$ は溶質の炭

素数の一次関数になっていると考えてよいので、 $(\partial \ln K / \partial \text{CN})$ は定数  $\times f(r_p, r_{\text{sp}}, \epsilon_{\text{ab}}, \epsilon_{\text{ad}}, T)$ になる。このような理由で、 $\alpha'_{\text{CN}}$ の炭素含量依存性は、保持比の炭素含量依存性に類似している。

一方  $\alpha'_{\text{DB}}$ は  $\alpha'_{\text{CN}}$ と異なり、高い結合密度における減少の程度は小さい。これは、不飽和度に対する選択性がメチレン基選択性と性質を異にすることを示している。二重結合数の差によって分子間に極性の差が生じるが、溶媒が極性液体の場合には、その極性分子間相互作用のために、不飽和度に対する選択性が大きくなる（第五章）。しかし、 $\text{C}_{18}$ リガンドは非極性炭化水素鎖であり、その分子間相互作用は分散力だけになるため、リガンド-溶質間相互作用力の  $\alpha'_{\text{DB}}$ への寄与は小さいと考えられる。Sentellらは、四環芳香族炭化水素間の選択性が  $\text{C}_{18}$ 結合密度の増加に対して直線的に増大することを確かめ、フェニル選択性のような"shape selectivity"は固定相リガンドの秩序化によって増大することを示した<sup>40)</sup>。LCおよびSFCにおける  $\alpha'_{\text{DB}}$ と  $\text{C}_{18}$ 結合密度の関係から、トリグリセリドの不飽和度に対する選択性は一種の"shape selectivity"と捉えることができる。

また、極性液体の方が  $\text{CO}_2$ よりも高い  $\alpha'_{\text{DB}}$ を示す。この理由は第五章で考察したように、極性の大きい溶媒分子では、その極性分子間相互作用力によって不飽和度に対する選択性が大きくなる。一方、 $\text{CO}_2$ は非極性分子であり相互作用は分散力だけとなるため、溶質の極性差に基づく相互作用エネルギー差が小さくなる。

このように、トリグリセリド間の炭素数に基づく選択性、不飽和度に基づく選択性は充填剤の炭素含量に対して異なるパターンで影響される。そのためトリグリセリドの溶出挙動は  $\text{C}_{18}$ 固定相の結合基密度によって変化する。

### 6-3-5 トリグリセリド混合物の分離挙動

6-3-1で述べたように、天然脂質のトリグリセリド成分は多くの分子種の集合体である。 $\text{C}_{18}$ 固定相のSFCによってトリグリセリドは幾つかのピークに分かれるが、そのピークは異なる分子種の混合物となっている。このことから、トリグリセリドは規則的に溶出することを示している。

前節で調べたように、トリグリセリドの保持はその炭素数と二重結合数に依存している。逆相LCでは、溶出順序として、 $\text{PN}_{\text{LC}}$  (partition number = CN (炭素数) - 2DB (二重結合数))の順に溶出するという報告がある<sup>27-29)</sup>。つまり、二重結合1個分の保持の変化は炭素数2個分に相当する。実際のクロマトグラフィーでは、DBの

係数は必ずしも2とは限らず、トリグリセリドを構成する脂肪酸の種類によって異なる<sup>41,42</sup>)。Table 6-7に示した本実験の結果では、LCにおける二重結合1個の寄与は炭素数2.3~2.6個に相当し、固定相の特性に依存している。そのため、段数の高いカラムを用いるとさらに多くのピークに分けることができる<sup>41-43</sup>)。そこでPNの代わりにECN(equivalent carbon number)を用いて、トリグリセリドの溶出挙動を記述することが行われている<sup>44-46</sup>)。飽和トリグリセリドの保持比の対数は炭素数に対して直線になるので、それを基準として、不飽和トリグリセリドの相当炭素数ECNが実際の保持比から決められる。Podlahaによると、二重結合のECNへの寄与の大きさは、そのトリグリセリドの不飽和度に依存しており、不飽和度の大きいものほど二重結合1個当たりのECNへの寄与は小さくなる<sup>44</sup>)。SFCでも、飽和トリグリセリドの保持の対数は炭素数に対して直線的になるので(Fig. 6-11)、各トリグリセリドのECNは実際のSFCの保持比から求められる。LCおよびSFCにおけるトリグリセリドのECNをTable 6-8に示した。

SFCでは不飽和度に対する選択性がLCと比較して小さく、二重結合1個当たり炭素数1.0~1.2に相当する(Table 6-7)。そのため、不飽和トリグリセリドのECNはLCよりも大きな値となる。言い替えると、不飽和度の違いによるECNの差はSFCでLCよりも小さくなる。SFCとLCにおけるこの違いが、トリグリセリド混合物の分離挙動に影響を及ぼす。糸状菌の中性脂質をITHVで分離した例をFig. 6-15に示した。またエゴマ油の分離例をFig. 6-16に示した。分離されたピークの保持時間からECNを計算し、その結果を図中に示した。

LCではピーク間のECN差は2前後であり、またピーク割れ、ショルダーの発生から、ピークを形成する分子種は1つではないことが分かる。多くの植物油脂、糸状菌油脂を構成するトリグリセリドは、偶数の炭素数の脂肪酸から構成されており、また二重結合1個のECNへの寄与は2に近いことから、ピークはECN差が2毎に現れたものである。一方SFCではピーク間のECNの差は0.7~1.0であり、これは二重結合1個当たりのECNへの寄与が約1と小さいためである。ただし不飽和度の大きいトリグリセリドでは、二重結合1個当たりのECNへの寄与は小さくなる。たとえばSFCにおいて、PTHV1のカラムでTSとTOの間のECNの差は3.2であるが、TOとTLの間のECN差は2.5である。LCではTSとTOの間には7.1の、TOとTLの間には6.4のECN差がある。糸状菌(Table 6-4)、エゴマ油の初期流出成分は不飽和度が高く、そのためピーク間のECNの差が小さくなったものと考えられる。

本実験条件において、炭素数1個に対する選択性( $\alpha'_{CN}$ )がLCとSFCでほぼ等しいことから、SFCの方がよりピークが接近して出てくることになる。そのため、

SFCにおける分離挙動はECNの変化に敏感であると考えられる。Fig. 6-17に炭素含量の小さい充填剤MTHV1における糸状菌脂質のLC、SFC分離を示す。LCでは、ピークはECNが2単位で分かれている。一方、SFCではトリグリセリドの規則的な溶出は観察されず、Fig. 6-15に示されたような分離は得られなかった。SFCではピークがより接近して出てくるため、ECNの変化のSFC分離挙動に及ぼす影響が顕著に現れたと考えられる。

また、残留シラノール基による吸着作用が強いゲルPTHL1を用いた場合の結果をFig. 6-18に示す。SFCではトリグリセリドの規則的な溶出は観察されないが、LCではITHVの場合と類似した分離挙動が得られる。これは吸着作用のECNに及ぼす影響がSFCでより大きいことによる。例えば、ITHVとPTHL1におけるトリリノレインのECNの差をTable 6-8を用いて比較すると、LCでは $40.3 - 39.8 = 0.5$ 、SFCでは $48.2 - 47.1 = 1.1$ となる。LCではシラノール基は極性液体でマスクされるため、吸着の影響が緩和されるが、 $\text{CO}_2$ は非極性分子であるためそのような効果は小さい。吸着の影響は、SFCでピークのテーリング、不溶出を引き起こすだけでなく、ECNをも大きく変化させる。

ITHLの充填剤は炭素含量が高く、不飽和度に対する選択性が大きい。ITHLのカラム用いた場合の糸状菌油脂の分離挙動の結果をFig. 6-19に示す。LCの場合、ITHVのカラムではECN=2の単位で溶出していたピークは、ITHLのカラムではさらにショルダー部分がピークとして分かれるようになる。これは、ITHLの充填剤では二重結合によるECNの変化が大きいこと、不飽和度の違いによってピークが分離されたものと考えられる。トリリノレインのECNはITHVで40.3、ITHLで39.3であり、飽和トリグリセリドを基準とした場合、後者のカラムの方が溶出順序は早くなる。即ち、ECN=2で溶出していたピークのうちで、不飽和度の高いトリグリセリド分子種ほど前に溶出するピークに近付いて行く。またSFCでは、ECN=0.9~1の間隔でピークが観察されており、規則的な溶出が得られている。しかし、ピーク間の分離はシャープではなく、重なりが観察された。ITHLのゲルを用いたSFCでは炭素数1個に対する選択性( $\alpha'_{\text{CN}}$ )が小さい(Table 6-7)、即ちECN1当たりの選択性が小さいため、ピーク間が接近したものと考えられる。

以上のように、多数の分子種からなるトリグリセリド混合物を $\text{C}_{18}$ 結合充填剤を用いてクロマト分離した場合、トリグリセリドはその炭素数と二重結合数に従って分離される。LCによる糸状菌油脂の分離では、トリグリセリドは幾つかのピークに分かれるが、そのピーク間隔はECN=2の単位であった。これは構成脂肪酸が偶数の炭素数を持ち、二重結合1個当たりのECNへの寄与が2に近いからである。二重結合数に対する選択性が大きい充填剤では、ECN=2で分離したピークはさらに幾つ

かのピークに分裂するようになる。一方SFCでは、ECN=0.7~1.0の間隔でピークが現れる。これは、SFCでは二重結合に対する選択性がLCよりも小さく、二重結合1個当たりのECNへの寄与が1程度のためである。トリグリセリドの不飽和度が大きくなると二重結合1個当たりのECNへの寄与は小さくなるため、ピークはより短いECN間隔で分離される。SFCにおけるトリグリセリド混合物の分離挙動は、LCの場合と比べ固定相の特性の影響を受けやすいが、この理由として、1) シリカ表面の不活性化度のピーク形状、ECNにおよぼす影響がSFCで大きいこと、2) 分離のECN間隔がSFCで小さいため、ECN変化の分離挙動におよぼす影響が大きくなること、が挙げられる。

#### 6-3-6 温度圧力のトリグリセリド分離挙動への影響

SFCにおいて、移動相特性を変える最も簡単な方法は、温度圧力を調節することである。圧力は、移動相の溶解力に影響を及ぼし、温度は移動相特性だけでなく、固定相の特性も変化させる。C<sub>18</sub>結合シリカを充填剤とするSFCによる脂質の分離を行い、温度圧力によってトリグリセリドの溶出挙動がどのような影響を受けるか調べた。Fig. 6-20にカラムMTHV1、PTHL1における $\alpha'_{CN}$ 、 $\alpha'_{DB}$ の圧力依存性を示す。圧力15-28 MPa、303-323 Kの実験範囲では圧力の変化による $\alpha'_{DB}$ の変化は小さい。 $\alpha'_{CN}$ は圧力の増大によって減少する。トリグリセリドの $\alpha'_{CN}$ の圧力依存性は、脂肪酸エステルの選択性と同様にMartireの式5-3、5-4から説明できる。その式には、移動相密度の増大によって保持が低下するような条件では、溶質のサイズに対する選択性 $\alpha'_{CN}$ は密度の増大によって低下することが示されている。また、温度の低下によって $\alpha'_{DB}$ が増大するが、これは式5-11から類推できる。式5-11の $(\epsilon_{ab}/\epsilon_{bb})$ が溶質の二重結合数に対して一次関数的であるならば、不飽和度に関する選択性は一定密度では温度に反比例する。

また、各トリグリセリドのECNの温度、圧力による変化をTable 6-9に示す。ここでは、充填剤としてMTHV1、PTHL1、ITHL、ITHVを取り上げた。圧力の増大によって不飽和トリグリセリドのECNは減少する。ただし、二重結合数の少ないトリグリセリドではその低下は顕著ではない。これは次のように考えられる。ECNはその定義から、二重結合の保持におよぼす影響を炭素数で示したものと見なすことができる。圧力の増大によって $\alpha'_{CN}$ が減少し、一方 $\alpha'_{DB}$ が変化しないため、相対的に二重結合のECNにおよぼす影響が増大する。従って、不飽和度の大きいトリグリセリドのECNほど圧力依存性が大きくなる。また、28 MPaで温度を上げると、ECNは大



きくなる。Fig. 6-21に示されるように温度は $\alpha'_{CN}$ 、 $\alpha'_{DB}$ の両者に影響するが、特に二重結合に対する選択性を減少させる。このため、相対的に二重結合のECNにおよぼす影響が増大する。

SFCではECNは温度圧力によって変化させることができる。即ち、トリグリセリドピークの分離挙動は温度圧力に依存する。25 MPa, 313 Kの分離条件で、ITHVの充填剤では糸状菌トリグリセリドは幾つかのピークに分離されたが (Fig. 6-15)、MTHV1 (Fig. 6-17)、PTHL1 (Fig. 6-18)の充填剤ではトリグリセリドの規則的な溶出は観察されなかった。そこで、ITHVでの分離挙動に近付けるよう、温度圧力を調整した。MTHV1の充填剤は二重結合に対する選択性が小さい。そこで、温度を下げ圧力を上げることによって、そのECNを小さくする。Table 6-9に示したように、温度を313 Kから303 Kに、圧力を25 MPaから28 MPaにすることで、MTHV1におけるトリノレニンのECNは48.9から48.0になり、ITHVの313 K, 25 MPaでの値48.2に近づく。このとき、Fig. 6-21に示したように、糸状菌のトリグリセリドはITHVの場合 (Fig. 6-15)と同様に幾つかのピークとして分かれた。図中にはピークのECNを示したが、0.8-1.0程度の規則的な溶出を示している。

また、PTHL1の充填剤はその残留シラノール基による吸着性のために、二重結合数に対する選択性が大きい。そこで温度を上げることでECNを大きくする。温度を313 Kから323 Kに、圧力を25 MPaから20 MPaにすることで、PTHL1におけるトリノレニンのECNは47.1から48.5になる。このとき、Fig. 6-21に示したように、糸状菌のトリグリセリドは幾つかのピークとして分かれた。図中にはピークのECNを示したが、溶出初期のピークを除いてECN=0.7~1.0程度の間隔で分離されている。しかし、Fig. 6-15に示されるようなシャープな分離は得られておらず、これは吸着の影響によるテーリング、ピーク広がり原因と考えられる。

以上のように、SFCにおけるトリグリセリドの選択性は温度、圧力の影響を受ける。SFCの温度圧力を調節することで、多分子種から成るトリグリセリド混合物を規則的なECN間隔の幾つかのピークに分離できる。ただし、充填剤表面が十分不活性化され、吸着によるテーリング等の影響が見られないことが必要である。

#### 6-4 結言

$C_{18}$ 結合固定相を用いたトリグリセリドの分離挙動について以下の知見が得られた。

1) 市販充填剤を用いてトリグリセリドの分離挙動をSFCおよびLCで比較したところ、SFCでの分離挙動とLCでの分離挙動との間に明確な相関は観察されなかった。これは、SFCの分離挙動が固定相の特性、特に吸着性の影響を大きく受

けるためであり、SFC独自の充填剤の評価法が必要である。

2) 調製C<sub>18</sub>結合シリカゲルについて、トリグリセリドの分離挙動を測定した。トリグリセリドの保持は充填剤の炭素含量、シリカ表面の不活性化の程度に依存する。SFC、LCともに、溶質の保持は固定相の炭素含量の増大と共に増大し、ある値で最大値に達した後、炭素数の増大によって減少する。また、残留シラノール基による吸着性の影響はLCでは小さいが、SFCは吸着性の影響を受けやすい。これは逆相LCでは極性の移動相が用いられ、それがシラノール基をマスクするためである。

3) トリグリセリドの選択性は炭素数に対する選択性、二重結合数に対する選択性に分けられる。SFCとLCにおけるトリグリセリドの分離挙動の差は、二重結合数に対する選択性が液体の方が大きいことに由来する。超臨界CO<sub>2</sub>とアセトン/アセトニトリル(4:1)を比較すると、二重結合に対する選択性は後者の方が倍以上大きくなる。両選択性は固定相の炭素含量にも依存する。

4) LCでは、二重結合1個分の保持の低下は炭素数2.3~2.6個分の保持の変化に対応する。一方SFCでは、二重結合1個分は炭素数1.0~1.2個分に対応する。しかし、分子の不飽和度が大きくなると、二重結合1個当たりの保持への寄与は小さくなる。

5) トリグリセリドの溶出順序を記述するため、ECN(equivalent carbon number)を導入した。不飽和トリグリセリドのECNは、その保持の大きさに対応する飽和トリグリセリドの炭素数として定義される。LCで天然油脂のトリグリセリド成分を分離した場合、ピーク間のECN差は約2で溶出する。これは、多くの植物油脂、糸状菌油脂を構成するトリグリセリドは、偶数の炭素数の脂肪酸から構成されており、また二重結合1個のECNへの寄与は2に近いためである。一方SFCではピーク間のECNの差は約0.7~1.0であり、これは二重結合1個当たりのECNへの寄与が1程度と小さいためである。

6) 本実験条件において、炭素数1個に対する選択性( $\alpha'_{CN}$ )がLCとSFCでほぼ等しいことから、SFCの方がよりピークが接近して出てくることになる。そのため、SFCにおける分離挙動はECNの変化に敏感である。LCでは類似した溶出挙動を示す充填剤であってもSFCでは全く異なる分離となるのは、このことが一つの理由である。

7) SFCで、トリグリセリドのECNは温度圧力の影響を受ける。圧力の増大によりECNは減少し、温度の上昇によってECNは上昇する。従って、温度圧力を調節することで、多分子種から成るトリグリセリド混合物を規則的なECN間隔の幾つかのピークに分離できる。

## REFERENCES

- 1) Wada, S., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **36**, 105 (1987).
- 2) Wojtusik, M. J., Brown, P. R., Turcotte, J. G., *Chem. Rev.*, **89**, 397 (1989).
- 3) Gere, D. R., Board, R., McManigill, D., *Anal. Chem.*, **54**, 736 (1982).
- 4) Blilie, A. L., Greibrokk, T., *Anal. Chem.*, **57**, 2239 (1985).
- 5) Jinno, K., Niimi, S., *J. Chromatogr.*, **455**, 29 (1988).
- 6) Kelley, F. D., Chimowitz, E. H., *AIChE J.*, **36**, 1163 (1990).
- 7) Lochmuller, C. H., Mink, L. P., *J. Chromatogr.*, **505**, 119 (1990).
- 8) Greibrokk, T., Berg, B. E., Foffmann, S., Norli, H. R., Ying, Q., *J. Chromatogr.*, **505**, 283 (1990).
- 9) Aubert, M.-C., Lee, C. R., Krstulovic, A. M., Lesellier, E., Pechard, M.-R., Tchaplá, A., *J. Chromatogr.*, **557**, 47 (1991).
- 10) Lesellier, E., Tchaplá, A., Pechard, M.-R., Lee, C. R., Krstulovic, A. M., *J. Chromatogr.*, **557**, 59 (1991).
- 11) Hirata, Y., *J. Chromatogr.*, **315**, 39 (1984).
- 12) Smith, R. M., Sanagi, M. M., *J. Chromatogr.*, **505**, 147 (1990).
- 13) Berger, T. A., Deye, J. F., *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 280 (1991).
- 14) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., Sakaki, K., Yokochi, T., *Anal. Chem.*, **61**, 2076 (1989).
- 15) Sakaki, k., Sako, T., Yokochi, T., Sugeta, T., Nakazawa, N., Sato, M., Suzuki, O., Hakuta, T., *J. Jpn. Oil Chem. Soc (Yukagaku)*, **36**, 943 (1987).
- 16) Sakaki, k., Sako, T., Yokochi, T., Suzuki, O., Hakuta, T., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **37**, 54 (1988).
- 17) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., Fukushima, K., Nobuhara, K., *Anal. Sci.*, **5**, 335 (1989).
- 18) Taylor, L. T., Chang, H.-C. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 357 (1990).
- 19) Engelhardt, H., Gross, A., Mertens, R., Petersen, M., *J. Chromatogr.*, **477**, 169 (1989).
- 20) Nomura, A., Yamada, J., Tsunoda, K., *J. Chromatogr.*, **448**, 87 (1988).
- 21) Jones, K., *J. Chromatogr.*, **392**, 1 (1987).
- 22) Jones, K., *J. Chromatogr.*, **392**, 11 (1987).
- 23) Buszewski, B., Jurásek, A., Garaj, J., Nondek, L., Novák, I., Berek, D., *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 2325 (1987).
- 24) Kinkel, J. N., Unger, K. K., *J. Chromatogr.*, **316**, 193 (1984).

- 25) Sudo, Y., Takahata, Y., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 04, 212, 058, 3, Aug. (1992).
- 26) Berger, T. A., Deye, J. F., *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 390 (1991).
- 27) Plattner, R. D., Spencer, G. F., Kleiman, R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 511 (1977).
- 28) Wada, S., Koizumi, C., Nonaka, J., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **26**, 95 (1977).
- 29) Wada, S., Koizumi, C., Takiguchi, A., Nonaka, J., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **27**, 579 (1978).
- 30) Dorsey, J. G., Dill, K. A., *Chem. Rev.*, **89**, 331 (1989).
- 31) Dill, K. A., *J. Phys. Chem.*, **91**, 1980 (1987).
- 32) Sentell, K. B., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.*, **61**, 930 (1989).
- 33) Martire, D. E., Boehm, R. E., *J. Phys. Chem.*, **87**, 1045 (1983).
- 34) Strubinger, J. R., Parcher, J. F., *Anal. Chem.*, **61**, 951 (1989).
- 35) Parcher, J. F., Strubinger, J. R., *J. Chromatogr.*, **479**, 251 (1989).
- 36) Strubinger, J. R., Song, H., Parcher, J. F., *Anal. Chem.*, **63**, 98 (1991).
- 37) Strubinger, J. R., Song, H., Parcher, J. F., *Anal. Chem.*, **63**, 104 (1991).
- 38) Martire, D. E., Boehm, R. E., *J. Phys. Chem.*, **91**, 2433 (1987).
- 39) Martire, D. E., *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1569 (1987).
- 40) Sentell, K. B., Dorsey, J. G., *J. Chromatogr.*, **461**, 193 (1989).
- 41) Frede, E., Thiele, H., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 521 (1987).
- 42) Singleton, J. A., Pattee, H. E., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 534 (1987).
- 43) Maniongui, C., Gresti, J., Bugaut, M., Gauthier, S., Bezard, J., *J. Chromatogr.*, **543**, 81 (1991).
- 44) Padlaha, O., Töretgård, B., *J. Chromatogr.*, **482**, 215 (1989).
- 45) Rezanka, T., Mores, P., *J. Chromatogr.*, **542**, 145 (1991).
- 46) Geeraert, E., De Schuppen, D., *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **6**, 123 (1983).

Table 6-1 Fatty acid composition of fungi oil and perilla seed oil.

Fatty acid <sup>a)</sup>	composition (wt%)	
	fungi oil	perilla seed oil
C <sub>16:0</sub>	30.3	5.9
C <sub>16:1</sub>	1.3	-
C <sub>18:0</sub>	5.9	2.2
C <sub>18:1</sub>	46.1	21.5
C <sub>18:2</sub>	8.5	13.7
C <sub>18:3<math>\alpha</math></sub>	-	56.2
C <sub>18:3<math>\gamma</math></sub>	6.3	-
others	1.6	1.5

a) The left number of colon means carbon number of fatty acid and the right means the number of double bonds. C<sub>18:3 $\alpha$</sub>  and C<sub>18:3 $\gamma$</sub>  are  $\alpha$ -linolenic acid and  $\gamma$ -linolenic acid, respectively.

Table 6-2 Total carbon number (CN) and the number of double bonds (DB) of acyl-groups of each triglyceride. See the text for the abbreviations.

Triglyceride	CN	DB
Trimyristin (MMM)	42	0
Tripalmitin (PPP)	48	0
Tripalmitolein (PoPoPo)	48	3
POP	50	1
OPO	52	2
Tristearin (SSS)	54	0
SSO	54	1
OOS	54	2
Triolein (OOO)	54	3
Trilinolein (LLL)	54	6
Trilinolenin (LnLnLn)	54	9

Table 6-3 Characteristics of C<sub>18</sub>-columns tested in the experiments.

No.	packing <sup>a)</sup>	supplier <sup>b)</sup>	column size [L × I. D. mm]	particle diameter [μm]	pore diameter [nm]	surface area [m <sup>2</sup> /g]	C%	stationary phase <sup>c)</sup>
1	L-column ODS	CITI	150 × 4.6	5	12	340	17	P
2	Cosmosil 5C18	Nakalai	150 × 4.6	5	11	330	20	M
3	Cosmosil 5C18-AR	Nakalai	150 × 4.6	5	12	300	16	P
4	Inertsil ODS	GL Science	150 × 4.6	5	10	350	14	M
5	Inertsil ODS2	GL Science	150 × 4.6	5	15	320	18.5	M
6	Wakosil2-5C18	Wako	250 × 4.6	5	10	350	17	P
7	Supersil C18	Jasco	250 × 4.6	5	10	300	22	M
8	Soken ODS	Soken	150 × 4.6	5	11.3	343	21	M
9	TSK ODS-120T	Tosoh	150 × 4.6	5	12		22	P
10	W2-100P	Nippon Chemical	150 × 4.6	5	10	350	18	P
11	W2-100M	Nippon Chemical	150 × 4.0	5	10	350	19	M
12	W-120P	Nippon Chemical	150 × 4.6	5	12	300	16	P
13	F-100P	Nippon Chemical	150 × 4.6	5	10	300	15	P

a) The packings of No. 10, 11, 12 and 13 were prepared by Nippon Chemical according to the direction of the author. The base silica of W2-100P and W2-100M was Wakosil2-100 (Wako).

b) The base silicas of W-120P and F-100P were Wakosil-120 (Wako) and Finesil-100 (Jasco), respectively.

c) P: Polymeric, M: Monomeric

Table 6-4 Fatty acid composition of each triglyceride fraction in Fig. 6-2.

Fraction	Fatty acid ( % of total)								content (% of lipid)
	a)	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	
TG1 <sup>b)</sup>		12.6	28.9	15.1	2.1	33.2	2.3	5.9	0.3
TG2		7.5	24.0	8.6	1.3	10.9	9.9	37.9	2.0
TG3		4.4	33.3	6.2	-	13.8	15.1	27.0	4.7
TG4		1.5	29.9	7.3	0.2	26.5	17.0	17.7	11.9
TG5		0.3	39.3	-	0.5	38.4	15.1	6.3	13.1
TG6		0.2	33.5	-	0.5	57.2	7.3	1.4	13.2
TG7		0.1	28.0	-	1.5	68.9	1.0	0.5	13.0
TG8		0.3	32.1	-	24.8	40.4	1.3	1.2	1.9
TG9		-	14.9	-	9.5	40.5	21.4	13.7	2.7

a) This line shows carbon number and degree of unsaturation of each fatty acid.

b) TG: triglycerides.

Table 6-5 HETP, capacity factor of triolein, selectivity between tripalmitin and tristearin, and selectivity between triolein and tristearin on C<sub>18</sub> columns.

No.	packing	HETP(LC) <sup>b)</sup> [mm]	HETP(SFC) <sup>a)</sup> [mm]	k' <sub>TO</sub> (LC) <sup>b)</sup>	k' <sub>TO</sub> (SFC) <sup>b)</sup>	α <sub>TS/TP</sub> (LC) <sup>c)</sup>	α <sub>TS/TP</sub> (SFC) <sup>c)</sup>	α <sub>TS/TO</sub> (LC) <sup>d)</sup>	α <sub>TS/TO</sub> (SFC) <sup>d)</sup>
1	L-column ODS	0.032	0.021	3.02	9.44	1.76	1.78	2.08	1.41
2	Cosmosil 5C18	0.040	0.14	4.53	13.1	1.86	1.84	2.23	1.33
3	Cosmosil 5C18-AR	0.031	0.18	2.55	17.3	1.73	-	2.18	-
4	Inertsil ODS	0.030	0.023	4.39	27.0	1.79	1.89	1.98	1.39
5	Inertsil ODS2	0.032	0.064	3.68	7.97	1.76	1.72	2.13	1.38
6	Wakosil2-5C18	0.022	0.18	3.50	18.9	1.81	-	2.12	-
7	Supersil C18	0.072	0.047	5.57	12.6	1.92	1.85	2.37	1.43
8	Soken ODS	0.031	0.099	3.69	8.20	1.81	1.75	2.24	-
9	TSK ODS-120T	0.031	0.23	2.77	39.4	1.68	-	2.04	-
10	W2-100P	0.027	-	4.32	-	1.74	-	1.98	-
11	W2-100M	0.024	0.12	6.94	63.0	1.89	-	2.12	-
12	W-120P	0.022	-	3.14	-	1.77	-	2.07	-
13	F-100P	0.026	-	3.56	-	1.75	-	2.01	-

a) HETP values were calculated by eq. 6-1 on the basis of triolein peaks.

b) k'<sub>TO</sub>: capacity factor of tristearin.

c) α<sub>TS/TP</sub>: selectivity between tripalmitin and tristearin.

d) α<sub>TS/TO</sub>: selectivity between triolein and tristearin.

a, b, c, d) Conditions of LC: mobile phase acetone-acetonitrile (4:1), flow rate 1.0 mL/min, temperature 303 K. Conditions of SFC: mobile phase CO<sub>2</sub>, flow rate 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 25 MPa.



Table 6-6 Silanization conditions and carbon contents of prepared C<sub>18</sub> bonded phases.

packing	reaction with DMODCS			end-capping 1			end-capping 2	
	silane:silica ratio (g/g)	base	C%	silane	base	C%	silane	C%
MTHV1	0.15	morpholine	8.3	TMCS	morpholine	10.2	vapor HMDS	10.0
MTHV2	0.25	morpholine	10.5	TMCS	morpholine	11.9	vapor HMDS	11.6
MTHV3	0.34	morpholine	10.7	TMCS	morpholine	12.5	vapor HMDS	11.5
MTHV4	0.50	morpholine	12.3	TMCS	morpholine	13.5	vapor HMDS	12.7
MTHV5	0.99	morpholine	17.6	TMCS	morpholine	17.9	vapor HMDS	15.3
PT1	1.0	pyridine	16.7	TMCS	pyridine	17.0	liquid HMDS	17.3
PTHL1	1.0	pyridine	16.7	TMCS	pyridine	17.0	vapor HMDS	15.1
PTHV1	1.0	pyridine	16.7	TMCS	pyridine	17.0		
PT2	2.1	pyridine	17.7	TMCS	pyridine	17.8	vapor HMDS	16.4
PTHV2	2.1	pyridine	17.7	TMCS	pyridine	17.8		
IT	1.0	imidazole	18.9	TMCS	imidazole	19.4	TMCS	19.8
ITT	1.0	imidazole	18.9	TMCS	imidazole	19.4	liquid HMDS	19.8
ITHL	1.0	imidazole	18.9	TMCS	imidazole	19.4	vapor HMDS	16.4
ITHV	1.0	imidazole	18.9	TMCS	imidazole	19.4		
MT	1.0	morpholine	17.2	TMCS	morpholine	17.7	TMCS	18.0
MTT	1.0	morpholine	17.2	TMCS	morpholine	17.7	liquid HMDS	18.0
MTHL	1.0	morpholine	17.2	TMCS	morpholine	17.7	vapor HMDS	15.1
MTHV	1.0	morpholine	17.2	TMCS	morpholine	17.7		

Table 6-7 Characteristics of prepared C<sub>18</sub> bonded phases.

column	k <sub>ph</sub> <sup>a)</sup>	α <sub>py/ph</sub> <sup>b)</sup>	HETP <sub>LC</sub> <sup>c)</sup> [mm]	HETP <sub>SFC</sub> <sup>d)</sup> [mm]	LC <sup>e)</sup>		SFC <sup>f)</sup>			
					slope of log k' vs. CN <sup>f)</sup> log k' vs. DB <sup>g)</sup>	log k' <sub>TS</sub> k' <sub>TL</sub> <sup>h)</sup> 6	slope of log k' vs. CN <sup>f)</sup> log k' vs. DB <sup>g)</sup>	log k' <sub>TS</sub> k' <sub>TL</sub> <sup>h)</sup> 6		
MTHV1	0.25	2.2	0.032	0.018	0.0374	-0.0870	0.0820	0.0431	-0.0418	0.0363
MTHV2	0.27	2.7	0.020	0.012	0.0413	-0.0959	0.0899	0.0463	-0.0474	0.0409
MTHV3	0.26	4.9	0.021	0.015	0.0410	-0.0952	0.0896	0.0463	-0.0465	0.0404
MTHV4	0.28	3.1	0.024	0.015	0.0432	-0.101	0.0953	0.0480	-0.0492	0.0431
MTHV5	0.29	2.0	0.019	0.013	0.0455	-0.108	0.102	0.0471	-0.0511	0.0471
PT1	3.37	8.1	0.023	0.12	0.0440	-0.111	0.104	0.0498	-0.0848	0.0598
PTHL1	2.17	7.7	0.023	0.030	0.0443	-0.112	0.105	0.0468	-0.0694	0.0542
PTHV1	0.19	1.7	0.019	0.015	0.0461	-0.110	0.103	0.0481	-0.0521	0.0457
PT2	3.29	10.5	0.025	0.023	0.0435	-0.113	0.105	0.0471	-0.0739	0.0608
PTHV2	0.26	1.58	0.021	0.011	0.0462	-0.112	0.105	0.0460	-0.0506	0.0449
IT	1.02	17.4	0.027	0.020	0.0426	-0.114	0.105	0.0407	-0.0482	0.0448
ITT	0.87	14.3	0.027	0.022	0.0428	-0.114	0.106	0.0406	-0.0456	0.0440
ITHL	1.19	13.9	0.024	0.018	0.0427	-0.114	0.105	0.0397	-0.0486	0.0430
ITHV	0.29	1.29	0.019	0.012	0.0453	-0.109	0.103	0.0454	-0.0494	0.0443
MT	1.91	12.0	0.021	0.015	0.0431	-0.111	0.104	0.0462	-0.0528	0.0473
MTT	1.69	14.1	0.023	0.012	0.0432	-0.111	0.104	0.0429	-0.0510	0.0460
MTHL	1.53	14.5	0.023	0.014	0.0432	-0.111	0.104	0.0426	-0.0519	0.0455
MTHV	0.26	1.41	0.023	0.015	0.0455	-0.108	0.102	0.0476	-0.0491	0.0438

a) Mobile phase, supercritical CO<sub>2</sub>, temperature 313 K, pressure 15 MPa. b) Selectivity between pyridine and phenol. Mobile phase, supercritical CO<sub>2</sub>, temperature 313 K, pressure 15 MPa. c) HETP was calculated by eq. 6-1 on the basis of triolein peak. Mobile phase, acetone/acetonitrile(4:1), temperature, 303 K. d) Mobile phase, supercritical CO<sub>2</sub>, temperature 313 K, pressure 25 MPa. e) Mobile phase, acetone/acetonitrile(4:1), temperature, 303 K. f) Trimyrustin, tripalmitin and tristearin were used. g) Tristearin, SSO, OOS and triolein were used. h) TS: tristearin, TL: trilinolein. i) Mobile phase, supercritical CO<sub>2</sub>, temperature 313 K, pressure 25 MPa.

Table 6-8 Equivalent carbon number (ECN) of various triglycerides in LC and SFC.  
 Trimyristin (MMM); 42, tripalmitin (PPP); 48, tristearin (SSS); 54.

column	LC <sup>a)</sup>					SFC <sup>b)</sup>					
	LLL	OOO	OOS	SSO	SSO	LLL	POP	OPO	OOO	OOS	SSO
MTHV1	40.8	47.0	49.3	51.7	51.7	48.9	48.9	50.0	51.1	52.0	53.0
MTHV2	40.9	47.0	49.3	51.7	51.7	48.7	48.8	49.8	50.9	51.9	52.9
MTHV3	40.9	47.0	49.3	51.7	51.7	48.8	48.8	49.9	51.0	52.0	53.0
MTHV4	40.8	47.0	49.3	51.7	51.7	48.6	48.9	49.9	50.9	52.0	52.9
MTHV5	40.5	46.9	49.2	51.6	51.6	48.0	48.7	49.6	50.5	51.6	52.7
PT1	39.8	46.4	48.9	51.5	51.5	46.8	-	-	48.9	50.9	52.6
PTHL1	39.8	46.4	48.9	51.5	51.5	47.1	48.7	49.2	49.6	51.3	52.8
PTHV1	40.5	46.9	49.2	51.6	51.6	48.3	48.8	49.8	50.8	51.8	52.9
PT2	39.5	46.2	48.8	51.4	51.4	46.3	-	-	48.6	50.2	51.8
PTHV2	40.3	46.8	49.1	51.6	51.6	48.1	48.9	49.9	50.6	51.8	52.9
IT	39.1	45.9	48.6	51.3	51.3	47.4	-	-	50.2	51.4	52.6
ITT	39.2	46.0	48.6	51.3	51.3	47.5	-	-	50.5	51.6	52.8
ITHL	39.3	46.0	48.7	51.4	51.4	47.5	48.8	49.6	50.3	51.5	52.7
ITHV	40.3	46.8	49.2	51.6	51.6	48.2	49.0	49.9	50.7	51.8	52.9
MT	39.6	46.3	48.8	51.4	51.4	47.9	-	-	50.5	51.6	52.7
MTT	39.6	46.3	48.8	51.4	51.4	47.6	-	-	50.3	51.5	52.7
MTHL	39.6	46.3	48.9	51.5	51.5	47.6	48.5	49.3	50.3	51.5	52.7
MTHV	40.6	46.9	49.3	51.6	51.6	48.5	48.8	49.7	50.9	51.9	52.9

a) Mobile phase, acetone/acetonitrile(4:1), temperature, 303 K.

b) Mobile phase, supercritical CO<sub>2</sub>, temperature 313 K, pressure 25 MPa.

Table 6-9 The effect of temperature and pressure on ECN of triglycerides.

packing	T. [K]	P. [MPa]	ECN					
			LLL	POP	OPO	OOO	OOS	SSO
MTHV1	303	28	48.0	48.7	49.6	50.6	51.7	52.8
	308	28	48.5	49.0	50.0	50.9	51.9	52.9
	313	20	49.4	49.1	50.2	51.3	52.2	53.1
	313	25	48.9	48.9	50.0	51.1	52.0	53.0
	313	28	48.8	49.0	50.0	51.0	52.0	53.0
PTHL1	308	20	46.8	-	49.0	49.2	50.8	52.4
	308	28	46.2	47.8	48.3	48.6	50.6	52.3
	313	25	47.1	48.7	49.2	49.6	51.3	52.8
	313	28	46.6	48.4	48.8	49.2	50.8	52.4
	323	20	48.5	48.9	49.8	50.5	51.6	52.8
	323	25	48.2	49.0	49.8	50.4	51.6	52.8
ITHL	308	28	47.7	48.8	49.6	50.4	51.6	52.9
	313	15	48.6	48.9	49.8	50.9	51.9	52.9
	313	20	47.8	48.5	49.4	50.5	51.6	52.8
	313	25	47.5	48.8	49.6	50.3	51.5	52.7
	313	28	47.3	48.5	49.2	50.2	51.5	52.8
ITHV	303	28	47.3	48.8	49.5	50.3	51.5	52.8
	308	28	47.6	48.8	49.7	50.4	51.6	52.8
	313	20	48.5	48.9	49.9	50.9	51.9	52.9
	313	25	48.2	49.0	49.9	50.7	51.8	52.9
	313	28	47.9	48.9	49.8	50.6	51.7	52.9

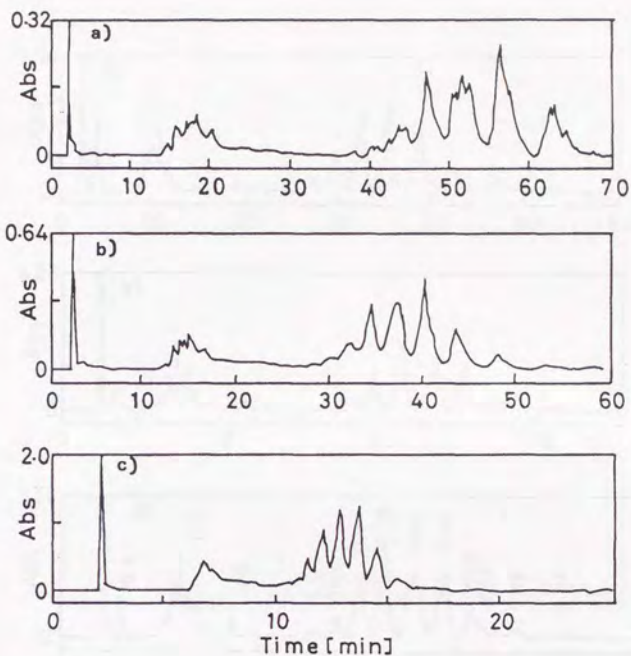


Fig. 6-1 Effect of the addition of hexane on SFC separation of fungi neutral lipid  
 Flow rate of hexane: a) 0.1 mL/min, b) 0.25 mL/min, c) 0.7 mL/min.  
 Chromatographic conditions, column: Suprapak Sil C18 ( $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 10\text{ mm I. D.}$ ),  
 mobile phase: supercritical  $\text{CO}_2$  with modifier, flow rate 5.4 g/min,  
 temperature: 313 K, pressure: 13.7 MPa, detector: UV detector (wave length 195-  
 350 nm).

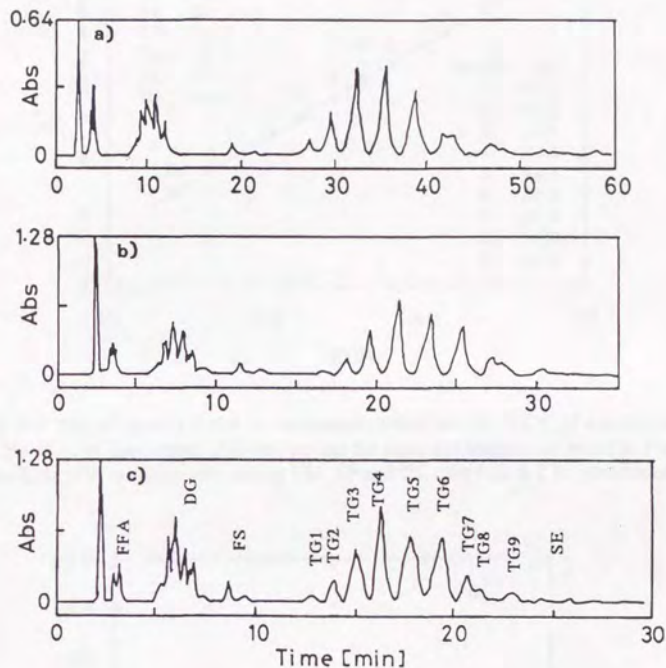


Fig. 6-2 Effect of the addition of methanol on SFC separation of fungi neutral lipid. Flow rate of methanol: a) 0.25 mL/min, b) 0.5 mL/min, c) 0.7 mL/min. See Fig. 6-1 for additional details.  
 FFA: free fatty acids, DG: diglycerides, FS: free sterols, TG: triglycerides, SE: sterol esters.

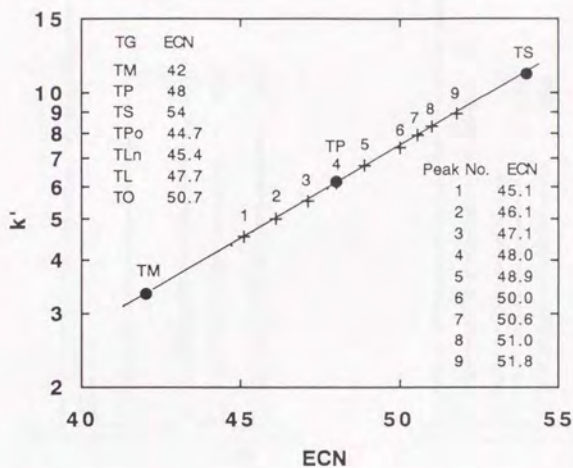


Fig. 6-3 Plot of capacity factor vs. equivalent carbon number (ECN) of standard triglycerides. ECN values of unsaturated triglycerides and the separated triglyceride peaks in Fig. 6-2 were determined with the linear plot among TM, TP and TS. See Fig. 6-2 for conditions.

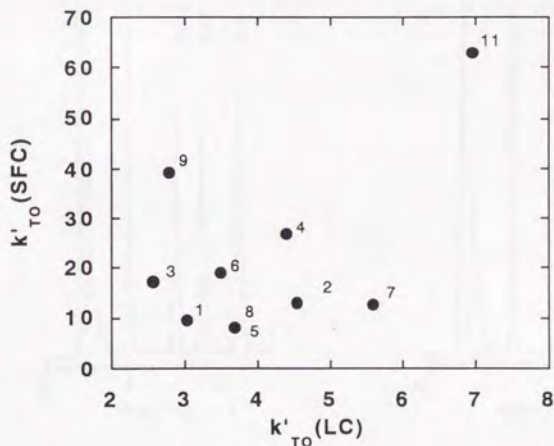


Fig. 6-4 Comparison in capacity factor of triolein between SFC and LC. See Table 6-3 for column used, and see the text for chromatographic conditions.

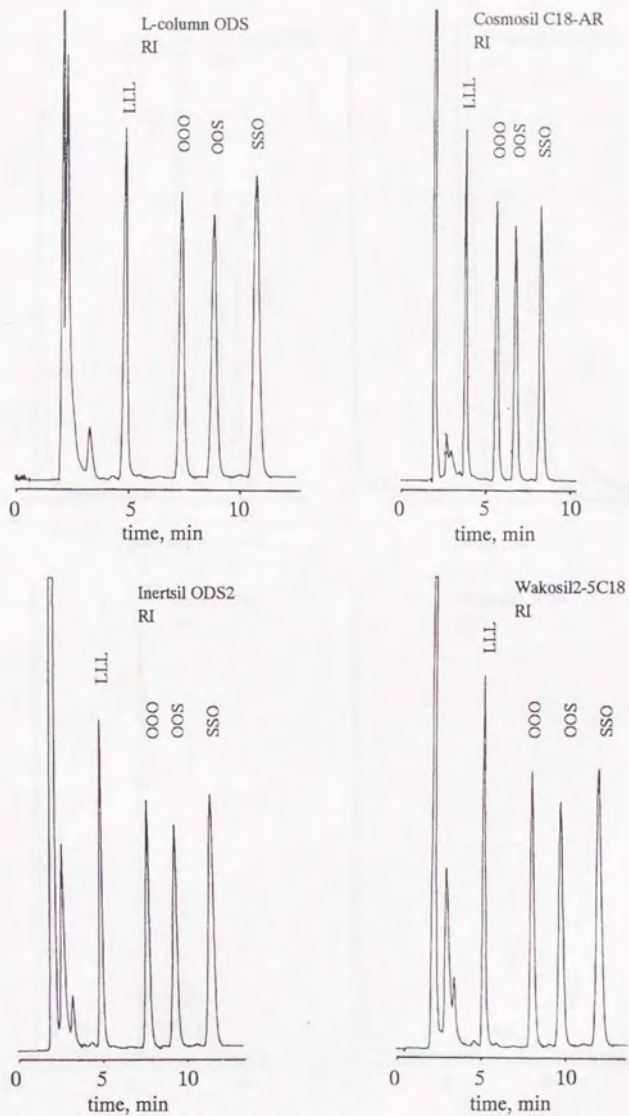


Fig. 6-5 Liquid chromatographic separation of trilinolein, triolein, OOS and SSO on various C18-columns. See the text for chromatographic conditions.



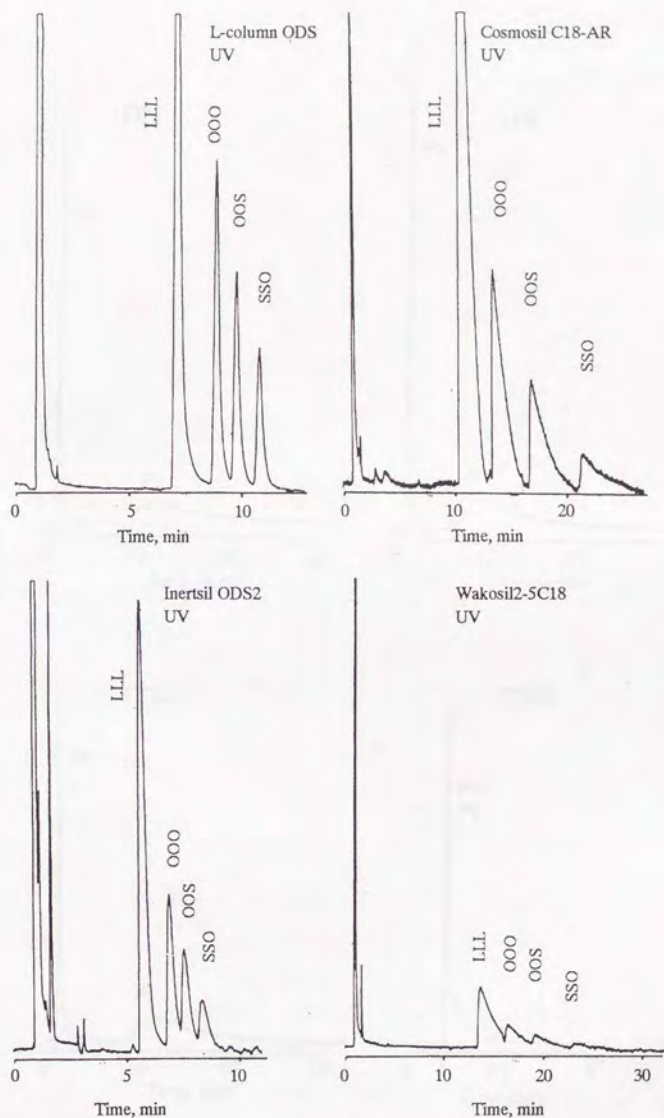


Fig. 6-6 Supercritical fluid chromatographic separation of trilinolein, triolein, OOO and SSO on various C18-columns. See the text for chromatographic conditions.

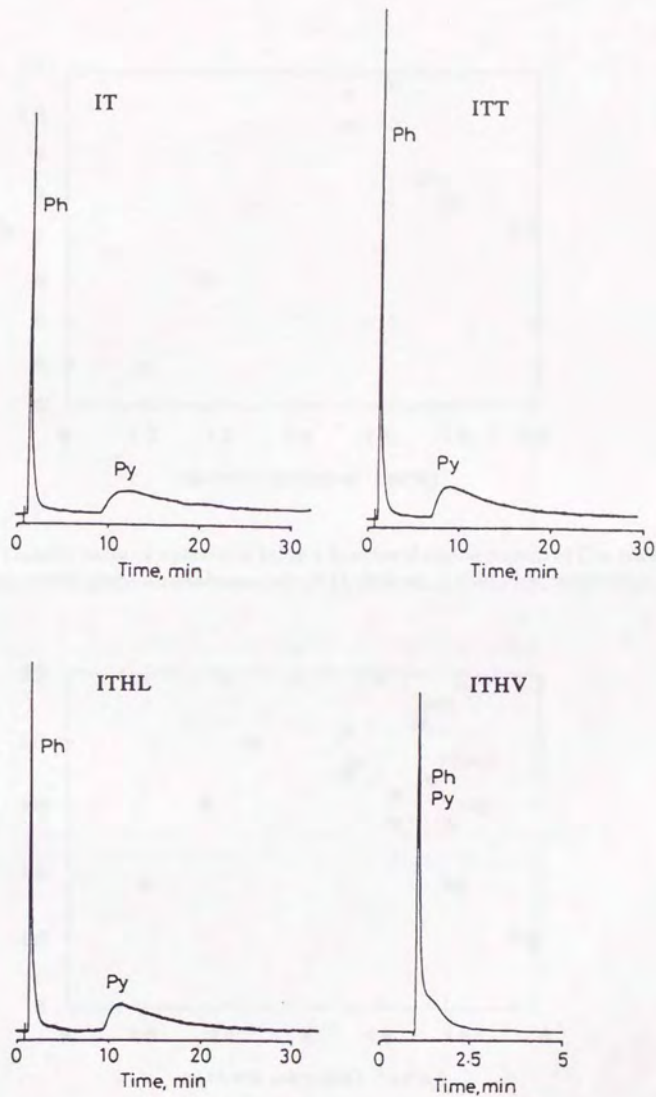


Fig. 6-7 Supercritical fluid chromatograms of phenol (Ph) and pyridine (Py) on IT, ITT, ITHL and ITHV gels. Conditions: mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 15 MPa, UV detection at 260 nm.

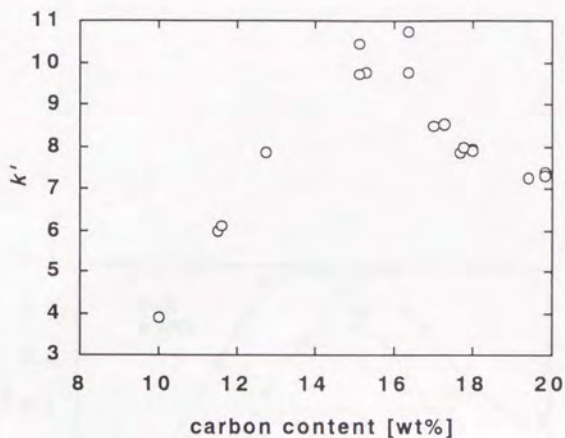


Fig. 6-8 Capacity factor of tristearin in LC as a function of carbon content of C18-bonded gels. Conditions: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1), flow rate 1.0 mL/min, temperature 303 K.

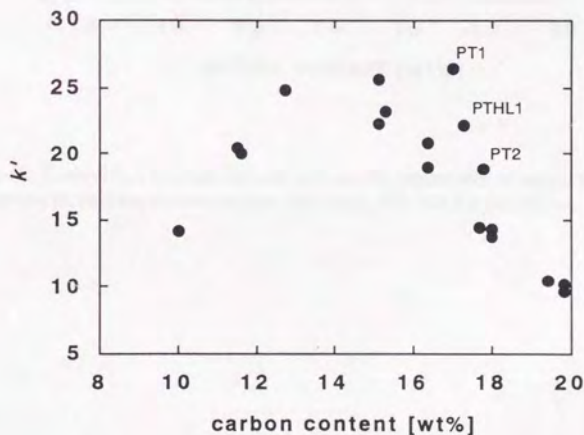


Fig. 6-9 Capacity factor of tristearin in SFC as a function of carbon content of C18-bonded gels. Conditions: mobile phase CO<sub>2</sub>, flow rate 1.8 g/min, temperature 313 K, pressure 25 MPa.

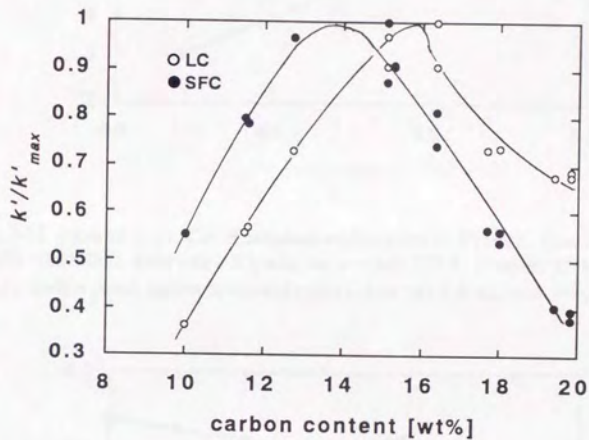


Fig. 6-10 Comparison between LC and SFC on the dependence of capacity factor of tristearin on packing-carbon content. See Figs. 6-8, 6-9 for conditions.

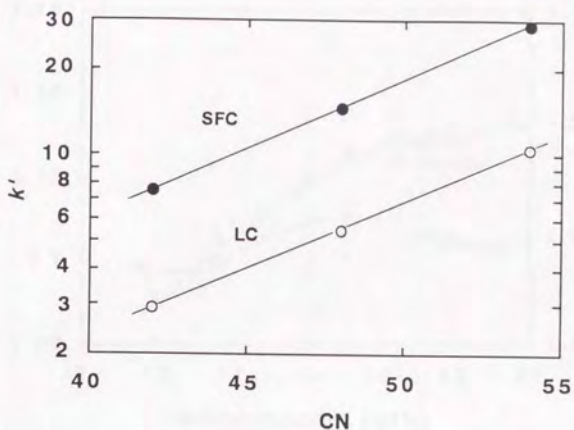


Fig. 6-11 Plots of  $k'$  vs. CN of saturated triglycerides on PTHV1. Conditions of SFC: mobile phase  $\text{CO}_2$ , flow rate 1.8 g/min, temperature 313 K, pressure 25 MPa. Conditions of LC: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1), flow rate 1.0 mL/min, temperature 303 K.

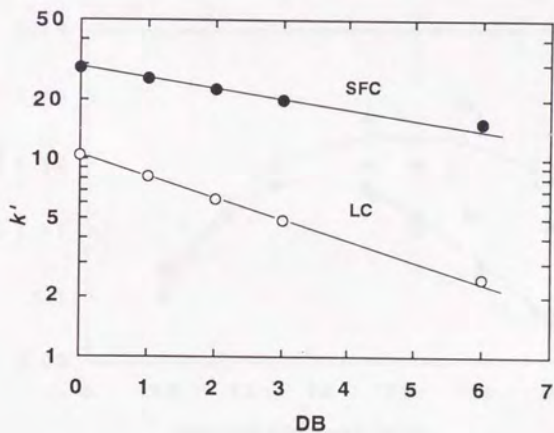


Fig. 6-12 Plots of  $k'$  vs. DB on PTHV1. See Fig. 6-11 for conditions. Sample used: SSS, SSO, OOS, OOO and LLL.

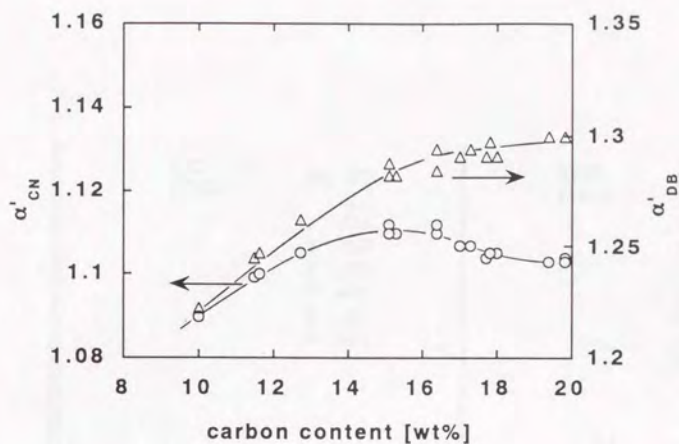


Fig. 6-13 Selectivities  $\alpha'_{CN}$  and  $\alpha'_{DB}$  in LC as a function of carbon content of  $C_{18}$ -bonded gels. (○)  $\alpha'_{CN}$ , (△)  $\alpha'_{DB}$ . See Fig. 6-8 for conditions.

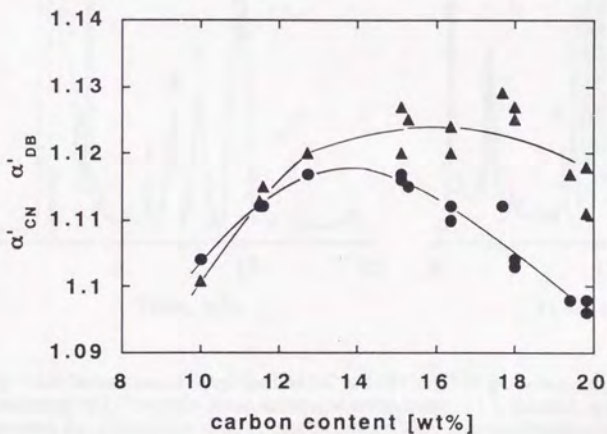


Fig. 6-14 Selectivities  $\alpha'_{CN}$  and  $\alpha'_{DB}$  in SFC as a function of carbon content of  $C_{18}$ -bonded gels. (●)  $\alpha'_{CN}$ , (▲)  $\alpha'_{DB}$ . See Fig. 6-9 for conditions.

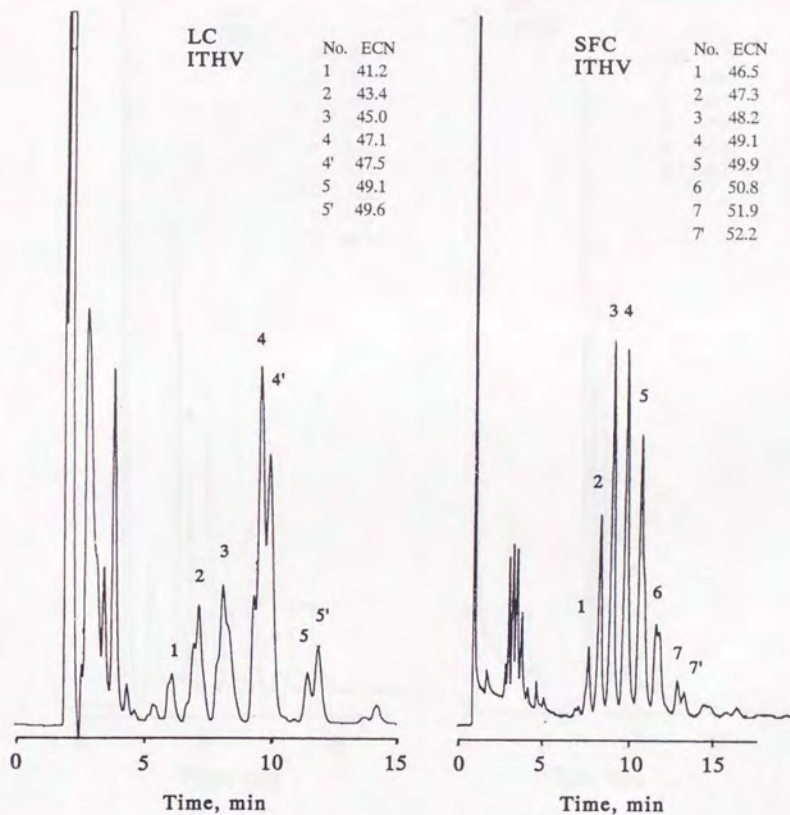


Fig. 6-15 Separation of fungi lipid by LC and SFC. ITHV gel was used as a stationary phase. Conditions of LC: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1) 1.0 mL/min, temperature 303 K, detection RI. Conditions of SFC, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 25 MPa, detection UV.

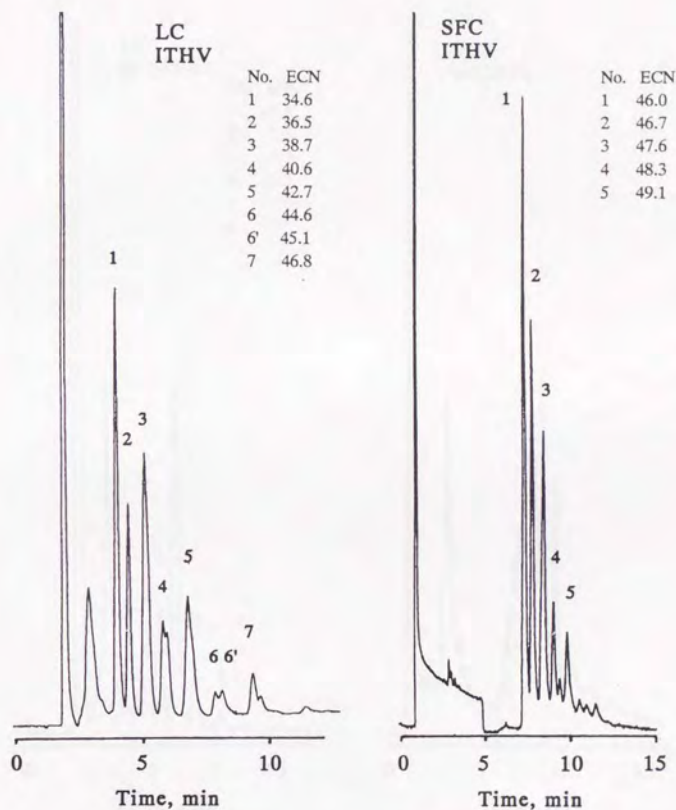


Fig. 6-16 Separation of perilla seed oil by LC and SFC. ITHV gel was used as a stationary phase.  
 Conditions of LC: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1) 1.0 mL/min, temperature 303 K, detection RI. Conditions of SFC, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 25 MPa, detection UV.



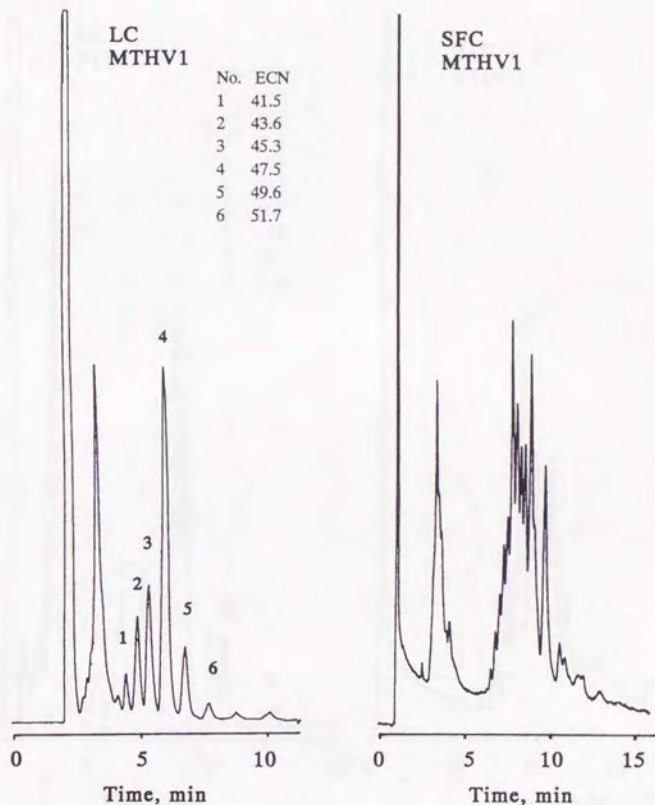


Fig. 6-17 Separation of fungi lipid by LC and SFC. MTHV1 gel was used as a stationary phase.  
 Conditions of LC: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1) 1.0 mL/min, temperature 303 K, detection RI. Conditions of SFC, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 25 MPa, detection UV.

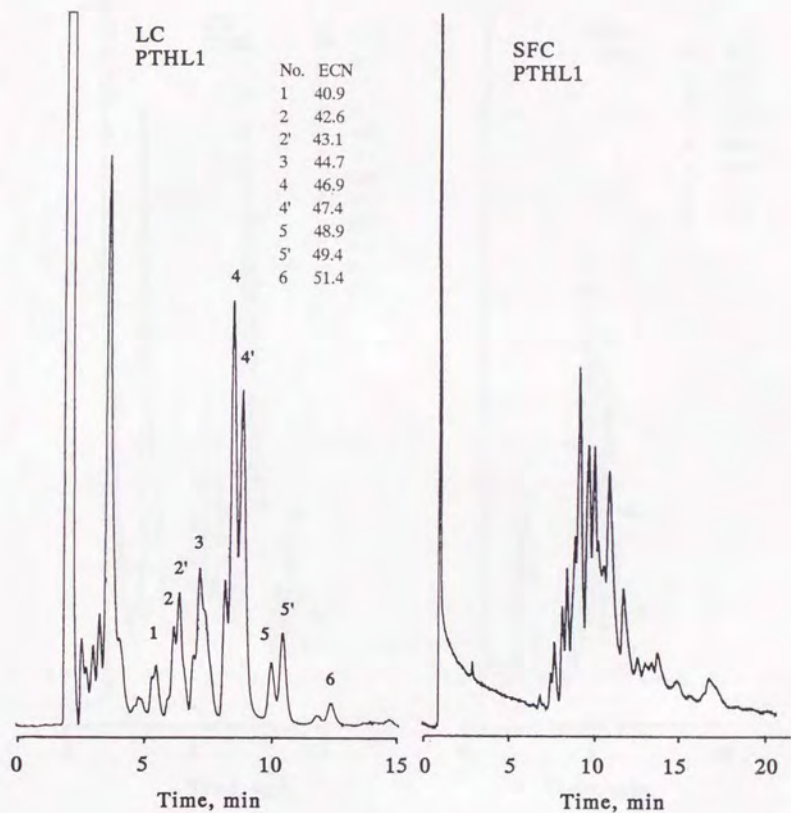


Fig. 6-18 Separation of fungi lipid by LC and SFC. PTHL1 gel was used as a stationary phase.  
 Conditions of LC: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1) 1.0 mL/min, temperature 303 K detection RI. Conditions of SFC, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 25 MPa, detection UV.

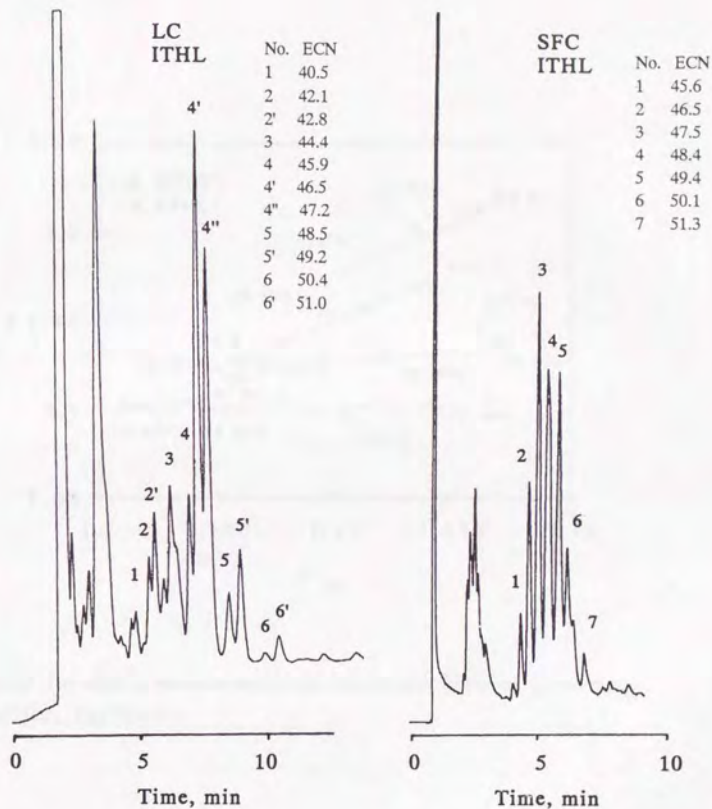


Fig. 6-19 Separation of fungi lipid by LC and SFC. ITHL gel was used as a stationary phase.  
 Conditions of LC: mobile phase acetone/acetonitrile (4:1) 1.0 mL/min, temperature 303 K, detection RI. Conditions of SFC, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 313 K, outlet pressure 25 MPa, detection UV.

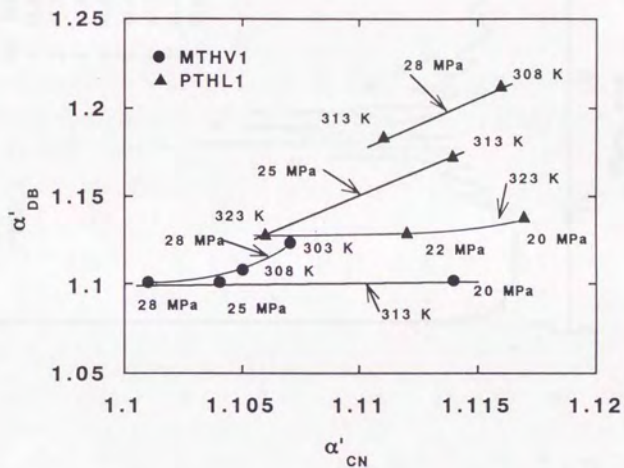


Fig. 6-20 The effect of pressure and temperature on selectivities  $\alpha'_{CN}$  and  $\alpha'_{DB}$ .  
 (●) MTHV1, (▲) PTHL1.

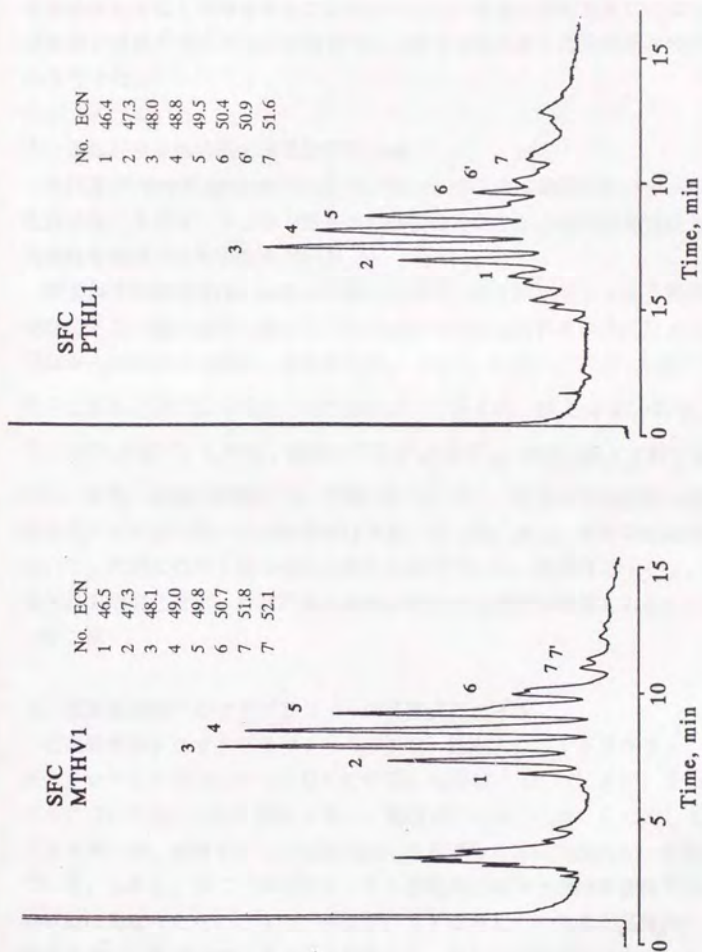


Fig. 6-21 Supercritical fluid chromatographic separation of fungi lipid on MTHV1 and PTHL1 gels. SFC conditions on MTHV1, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 303 K, outlet pressure 28 MPa, detection UV. SFC conditions on PTHL1, mobile phase CO<sub>2</sub> 1.8 g/min, temperature 323 K, outlet pressure 20 MPa, detection UV.

## 第七章 本研究の総括と展望

### 7-1 本研究の総括

本研究では、超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) 法が脂質の新しい分離分析手法として広く利用されることを目標とし、そのために SFC における脂質の分離挙動と分離メカニズムの解明を行い、脂質分離に適した充填剤の特性の解明と開発を行った。

#### 1) 超臨界流体抽出法による脂質の分離

糸状菌 *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* は、付加価値の高い  $\gamma$ -リノレン酸を生産する。その  $\gamma$ -リノレン酸を含む脂質の効率的な分離回収を目的として、超臨界流体を利用する抽出法を用いた。

超臨界流体抽出法は、溶媒の溶解力が温度、圧力によって大きく変化することが特徴であり、条件を少し変えることで溶質の抽出と回収を容易に行うことが出来る。菌体からの脂質の抽出を、超臨界  $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CHF}_3$ 、 $\text{SF}_6$  を用いて行った。これらは室温付近に臨界温度を持つ無機ガスであるが、 $\text{N}_2\text{O}$  が高い溶解力を示し、さらに  $\text{CO}_2$  が続く。しかし、油脂は  $\text{CHF}_3$  と  $\text{SF}_6$  にはほとんど溶解しなかった。さらに、温度、密度の影響について調べたところ、一定温度では密度の高い方が、一定密度では温度の高い方が溶解度は大きくなった。また、脂質の超臨界流体抽出において、初期に低分子量の成分が抽出されやすいが、抽出物の  $\gamma$ -リノレン酸濃度は抽出の間変化せず、超臨界流体抽出法単独では濃縮は困難であることが分かった。  
(第二章)

#### 2) 超臨界流体クロマトグラフィーの分離メカニズム

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) はガスクロマトグラフィー (GC)、液体クロマトグラフィー (LC) の中間に位置付けられているが、その分離メカニズムについて論じられた例は少ない。充填カラム SFC は LC と比して論じられることが多いが、実際 SFC の固定相として高速 LC 用の充填剤が一般的に用いられている。しかし、同じ充填剤であっても移動相が液体と超臨界流体では、溶質の分離挙動は異なったものとなる。そこで、SFC と LC の差異が具体的にどのような物性の違いに基づいているのかを明確にし、SFC の位置付けを行った。

$\beta$ -カロテンをプローブ分子として極性充填剤および非極性充填剤における SFC での保持挙動を調べ、逆相 LC、順相 LC で提案されている理論を用いて SFC

の保持を解釈した。逆相系充填剤のODSシリカにおける保持は、移動相の溶質に対する溶解力と相関があり、移動相がCO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>Oにかかわらず保持比の対数は溶解度の対数に対して一本の直線となる。この場合SFCは分配クロマトグラフィーに近い分離機構であり、また固定相の特性が移動相に影響されないという仮定が成立している。また、SFCの保持比の対数は移動相密度の対数に対して直線的に減少するが、これは、一定の移動相密度範囲では、溶解度の対数は密度の対数に対して直線的に減少するためである。厳密な理論式によれば、保持比の対数は密度の二次関数になることが示されている。その式では、溶質-溶媒間相互作用に基づく引力項と溶媒分子間相互作用に基づく斥力項があり、前者は密度の増大によって保持を低下させるよう働く。一方、斥力項は密度の2乗に比例して保持比の対数を増加させるよう働く。通常のSFCの圧力条件（圧力30 MPa以下）では、この溶質に対する斥力項は小さく溶質-溶媒間相互作用の方が支配的となるため、SFCの保持は圧力の上昇によって低下する。逆相LCの理論においても、移動相の保持への寄与として、溶質-溶媒間相互作用と溶媒分子間相互作用が考えられており、後者は移動相中に溶質サイズの空間を作るエネルギーに関与している。極性液体の場合、無極性の媒体と比べ溶媒分子間相互作用が大きいため、この移動相中に溶質サイズの空間を作るエネルギーが保持の重要なdriving forceとされている。（第三章）

このことは、溶解パラメーターの概念を用いて半定量的に説明できる。溶解パラメーターは、単位体積当たりの凝集エネルギーの平方根として定義されており、溶解パラメーターの大きい物質ほど分子間相互作用が大きいことになる。水素結合のような特殊な相互作用がない場合、溶解パラメーターの近い物質同士が混ざりやすくなる。油脂を対象とするSFC分離の場合、超臨界CO<sub>2</sub>の溶解パラメーターが油脂の溶解パラメーターよりも小さい範囲で操作される。油脂の凝集エネルギーの方が超臨界流体の凝集エネルギーよりも大きいため、油脂が移動相に解けにくく固定相に保持される。移動相密度の増大によって超臨界流体の溶解パラメーターは油脂の溶解パラメーターに近付き、その結果、溶質の溶解度が増大し保持が低下する。一方、逆相LCでは、移動相液体の溶解パラメーターが溶質の溶解パラメーターよりも大きいところで操作される。移動相液体は凝集エネルギーが大きく油脂が解けにくく、そのため固定相の方に保持される。このようにSFCと逆相LCでは移動相の保持への寄与が異なっている。（第五章）

極性充填剤を用いたSFCの保持機構は、非極性充填剤における保持機構とは根本的に異なっている。例えば、NH<sub>2</sub>シリカを充填剤としたSFCにおける保持比と移動相の溶解度のプロットは、CO<sub>2</sub>とN<sub>2</sub>Oで異なる直線となり、溶解度だけで整

理することは出来なかった。極性充填剤のSFCは一種の順相LCと捉えることができる。溶質が溶媒分子と吸着剤活性部をめぐって競合するというモデルを考慮すると、保持に重要となる移動相の特性は溶解力だけではなく、固定相への吸着性も大きな要因である。(第三章)

### 3) SFCにおける脂肪酸エステルの分離挙動と充填剤の効果

結合基量の異なるアミノプロピル基結合シリカゲルを調製し、それを充填剤とするSFCによって脂肪酸エステルの分離を行った。エステルの分離はその炭素数と二重結合数に依存し、炭素数が大きく二重結合の多いものほど溶出が遅れる。そのため、エステルの分離挙動は、炭素数に対する選択性と不飽和度に対する選択性で記述できる。また充填剤のアミノプロピル基結合密度が大きくなると、エステルの炭素数に対する選択性は増大し、一方二重結合数に対する選択性は減少した。二重結合数に対する選択性は充填剤の極性に依存し、炭素数に対する選択性はリガンドのプロピル基に由来すると考えられる。

極性溶媒を添加したヘキサンを移動相として分離を行った場合、脂肪酸エステルは二重結合数の差によって分離されるが、SFCで得られた炭素数に対する選択性は失われる。また、SFCで移動相の圧力を増すことによっても、炭素数に対する選択性は減少することから、炭素数に対する選択性は移動相の溶解力にも依存していることが示された。一方、不飽和度による選択性は圧力の影響を受けにくく、これは固定相の吸着作用が選択性の主な要因となっているためである。LCで溶質の保持を変化させるには、移動相の溶媒強度を変えるが、この時選択性も大きく変化する。そのため、望ましい時間内で分離を達成できるような溶媒選びが難しい。一方SFCでは圧力を変えることで保持が大きく変化するが、二重結合数に対する選択性の変化は小さい。これは、移動相の溶解力が変化するが、同じ媒体であるので固定相への吸着性が変化しないためである。分離条件探索は、SFCの方がより容易である。(第四章)

$C_{18}$ 結合シリカを充填剤として脂肪酸エステルの分離を行い、SFCとLCを比較した。この場合も、エステルはその炭素数と二重結合数に依存して分離された。炭素数が大きく二重結合の少ないものほど溶出が遅れる。不飽和度に対する選択性はアミノプロピル基結合シリカゲルの場合の逆になる。脂肪酸エステルは $PN_{SFC} (= \text{炭素数} - (2/3) \times \text{二重結合数})$ に従って溶出する傾向が見られた。ただし、この関係は温度、圧力、モディファイアーの添加によって変化するため、重なって溶出する成分も条件を変えることによって分離できるようになる。圧力の増大により炭素数に対する選択性は減少し、二重結合数に対する選択性は上昇する。このため、



$PN_{SFC}$ の係数2/3は圧力の増大によって大きくなる。また、逆相LCの場合も、脂肪酸エステルは炭素数と二重結合数に依存して分離される。アセトニトリル/メタノール系、メタノール/水系で分離を行ったが、 $PN_{LC} = \text{炭素数} - (1.6 \sim 2.0) \times \text{二重結合数}$ の溶出順序となる。このとき、不飽和度の大きいエステルほど二重結合1個当たりの $PN_{LC}$ への寄与は小さくなる傾向がある。SFCとLC間の二重結合に対する選択性の違いは、 $CO_2$ と極性液体の物性の違いによる。 $CO_2$ は非極性のため溶質との相互作用は分散力だけとなり、二重結合による溶質の極性の差に対して選択性をほとんど示さない。一方、極性液体はその極性相互作用または水素結合性相互作用のために、二重結合による溶質の僅かな極性の違いを捉え、高い選択性を示す。これは、溶解パラメーターを分散力、極性相互作用、水素結合性相互作用に分割したHansenのパラメーターを用いることによって半定量的に説明できる。(第五章)

また、温度313 K、圧力10~30 MPaの範囲では、炭素数1個に対する選択性はアミノプロピル基結合シリカで1.0~1.05、 $C_{18}$ 結合シリカで1.15~1.2である。一方、二重結合1個に対する選択性はアミノプロピル基結合シリカで1.2~1.3、 $C_{18}$ 結合シリカで1.15~1.18である。炭素数の違いを重視して分離するには $C_{18}$ 結合シリカゲルが、不飽和度の違いを重視して分離する場合にはアミノプロピル基結合シリカゲルが適していると言える。

#### 4) SFCにおけるトリグリセリドの分離挙動と充填剤の開発

現在、多数のメーカーから多種類の $C_{18}$ 結合充填剤が市販されている。それらを用いてSFCおよびLCにおけるトリグリセリドの分離挙動を調べたところ、SFCでの保持挙動は固定相によって大きく異なり、ピークのテーリング、不溶出が観察された。これはシリカ表面に残留するシラノール基の吸着作用によるものであり、この吸着の影響を低下させるために、SFCでは極性液体がモディファイアーとして移動相に添加されることが多い。しかし、モディファイアーの添加によって、溶質からの容易な脱溶剤性およびFID等のGC用検出器が使用できるというSFCの利点が失われる。そこで、モディファイアーを用いなくともトリグリセリドのシャープな分離が可能な、SFC用 $C_{18}$ 結合充填剤の開発を行った。 $C_{18}$ シランによる反応の後、ゲルをトリメチルクロロシランで処理し、さらに気相のヘキサメチルジシラザンを用い573 Kで24時間不活性化処理を行った。こうして得られた $C_{18}$ 結合シリカゲルでは、通常行われている液相での不活性化処理法と比べ飛躍的に吸着性が減少し、SFCにおいてシャープなトリグリセリドのピーク形状が得られた。

また、調製C<sub>18</sub>結合シリカにおけるトリグリセリドの分離挙動を測定し、充填剤特性との関係を調べた。トリグリセリドの分離はその炭素数と二重結合数に依存し、炭素数が大きく二重結合の少ないものほど溶出が遅れる。エステルの場合と同様、トリグリセリドの分離挙動は炭素数に対する選択性と不飽和度に対する選択性で記述される。両選択性と保持の強さは、固定相の吸着性だけでなく結合基密度(炭素含量)にも依存する。保持比、炭素数に対する選択性は、固定相の炭素含量が14%までは炭素含量とともに増大し、その値を越えると減少に転じる。一方、不飽和度に対する選択性は炭素含量に対して増大し、さらに高炭素含量域において低下するが、その減少は炭素数に対する選択性の場合に比べて小さい。トリグリセリドの溶出順序は両選択性のバランスによるため、固定相の炭素含量に依存する。

天然の中性脂質には、構成脂肪酸の異なる多数のトリグリセリドが含まれている。糸状菌のトリグリセリドを逆相LCで分離した場合、幾つかのピークに分離される。それらのピークにはさらに分子種の異なるトリグリセリドが含まれており、規則的な溶出が見られた。トリグリセリドの溶出位置を示すため、ECN(equivalent carbon number)を導入した。飽和トリグリセリドのECNはそのアシル基の総炭素数で表され、不飽和トリグリセリドのECNは、その保持の大きさに対応する飽和トリグリセリドの炭素数として定義される。LCでは、二重結合1個当たりのECNへの寄与は2.3~2.6であり、一方SFCでは1.0~1.2に相当する。ただし、不飽和度が高いトリグリセリドでは、二重結合1個当たりのECNへの寄与は小さくなる傾向がある。LCとSFCにおける二重結合のECNへの寄与の違いは、エステルの場合と同じく移動相の極性相互作用の違いに由来するものである。LCによる糸状菌油脂、エゴマ油の分離では、ECNが約2の間隔でピークが現れた。これは、糸状菌油脂、植物油の構成脂肪酸の多くは偶数の炭素数を持ち、また二重結合のECNへの寄与が2に近いためである。SFCによる糸状菌油脂、エゴマ油の分離では、ピーク間隔はECNにして0.7~1.0になる。短い間隔で溶出するのは、二重結合数のECNへの寄与が小さいためである。ECNは炭素数に対する選択性と不飽和度に対する選択性のバランスによって決り、またECNの変化は不飽和度の大きいトリグリセリドほど大きくなる。温度、圧力、充填剤の吸着性、炭素含量によって両選択性が変化すると、ピークはさらに幾つかのピークに分かれるか、あるいは逆にピークが規則的に重なり合うようになる。SFCではECNが短い間隔でピークが出るため、ECN変化の分離挙動におよぼす影響がLCよりも顕著に現れる。そのため分離の条件設定が難しくなる。(第六章)

##### 5) SFCによる脂質分離と充填剤

脂質をSFCを用いてモディファイアーを添加せずに分離する場合、充填剤選定の指針として次の様なことが挙げられる。

まず、極性の高いリン脂質、糖脂質は移動相に溶解しないため、そのままの形でSFCの適用は難しく、誘導体化が必要となる。

低分子（炭素数20程度までの）で低極性のエステル、炭化水素系物質等を極性の小さな差に基づいて分離する場合には、シリカゲル等の極性系充填剤が適している。溶質の分子量が大きく溶出に時間がかかる場合、温度圧力の増大によって保持を小さくできるが、さらにアミノ基、ジオール基を導入して極性を落した充填剤を用いることで溶出を早めることができる。極性系の充填剤の分子サイズに対する選択性は小さい。このことから、エステル類、トリグリセリド類、カロテンのような物質の種類毎に分離する場合に適当と言える。極性の高い遊離脂肪酸やアルコール類が溶質の場合では、充填剤への不可逆的吸着が生じるため、極性系の充填剤は不適である。

溶質の炭素数、疎水性の違いで分離する場合には、 $C_{18}$ 結合シリカのような非極性系充填剤が適する。非極性系充填剤では、極性の高い遊離脂肪酸等の物質の分離も可能である。しかし、シリカゲル表面にはシラノール基が残存しているため、その吸着作用によってテーリング、不溶出が生じる。完全にシラノール基をキャッピングすることは難しく、どのような $C_{18}$ 結合シリカも多少なりとも吸着性を持っている。また、 $C_{18}$ 結合シリカは分子サイズに対する選択性が大きい。そのため、同族体、同じ物質種間の相互分離に適している。分子サイズが大きく異なる物質種間の分離では、保持時間の差が大きくなる（例えばステアリン酸のメチルエステルとトリグリセリドでは保持比は20倍以上異なる）ため、圧力グラジエントのような工夫が必要になる。

なお、極性のモディファイアーの添加により、比較的極性の高い物質にも適用できるようになる。しかし、FIDの適用、マススペクトルへの導入が可能というSFCの利点が失われるため、目的に応じて考慮する必要がある。

## 7-2 今後の展望

SFCはGCとLCの中間の性質を持つと言われるが、移動相が高い密度の時はLCに近く、一方移動相が低密度で高温の時はGCに近くなる。本研究では、LCに近い条件での分離について検討し、またLCの延長としてSFCの分離メカニズムを考察した。GCに近い条件におけるSFCの分離メカニズム、それに適した充填剤あるいはキャピラリーカラムの開発が今後の課題と言える。

超臨界流体クロマトグラフィーにおける現在までの研究量、応用例は、ガスクロ

マトグラフィー、液体クロマトグラフィーに比べるとはるかに少ない。しかしながら、今後装置が普及し応用例が報告されるようになり、また、SFCの利点が生かせるような分離対象が見いだされれば、研究も活発になるものと期待できる。本研究でSFCは固定相の性質に敏感であることが分かったが、これは超臨界CO<sub>2</sub>が非極性で、溶質との相互作用、固定相におよぼす影響が液体よりも小さいことに由来している。言い替えば、固定相の特性が分離に良く反映されることになる。近年、光学活性なカラムを用いたクロマトグラフィーによる光学異性体の分割が活発に研究されるようになった。光学異性体の分離は固定相の認識能に依存するが、上述したような理由でSFCは光学異性体の分離に適するのではないかと思われる。実際、SFCの光学分割への適用が幾つか報告されるようになっている。今後、この方面の活発な研究が期待できる。

## 付記

本研究の内容は以下の報文にまとめられている。

榊, 佐古, 横地, 菅田, 中沢, 佐藤, 鈴木, 白田, "糸状菌による脂質の生産に関する研究(第18報) 超臨界流体クロマトグラフィーによる糸状菌油脂の構成脂肪酸エステル分離", *油化学*, **36**, 943(1987).

榊, 佐古, 横地, 鈴木, 白田, "糸状菌による脂質の生産に関する研究(第19報) 超臨界流体クロマトグラフィーによる菌体中性脂質の分離", *油化学*, **37**, 54(1988).

Sakaki, K., Yokochi, T., Suzuki, O., Hakuta, T., "Supercritical fluid extraction of fungal oil using CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CHF<sub>3</sub> and SF<sub>6</sub>", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 553(1990).

Sakaki, K., "Solubility of  $\beta$ -carotene in dense carbon dioxide and nitrous oxide from 308 to 323 K and from 9.6 to 30 MPa", *J. Chem. Eng. Data*, **37**, 249(1992).

Sakaki, K., "Supercritical fluid chromatographic separation of fatty acid methyl esters on aminopropyl-bonded silica stationary phase", *J. Chromatogr.*, **648**, 451(1993).

Sakaki, K., Shinbo, T., Kawamura, M., "Retention behaviors of  $\beta$ -carotene on polar and nonpolar stationary phases in supercritical fluid chromatography", *J. Chromatogr. Sci.*, **32**, 172(1994).

Sakaki, K., Shinbo, T., Nakane, T., Sudo, Y., Kudo, S., Chiwa, M., "Supercritical fluid chromatographic separation of triglycerides on various C18-bonded silica gels", submitted to *J. Chromatogr.*

## 謝辞

本学位論文をまとめるにあたり、東京大学工学部化学生命工学科 古崎新太郎教授には、ご多忙にもかかわらず格別のご高配とご指導を頂きました。心より深く感謝致します。

また本論文の審査にあたり、応用化学科 澤田嗣郎教授、化学生命工学科 長棟輝行教授、関実講師、化学システム工学科 中尾真一助教授から、有益で貴重なご意見を頂きました。深く感謝致します。

本論文を進めるにあたり、激励と指導を頂きました、工業技術院物質工学工業技術研究所の佐藤眞士部長、白田利勝部長、河村光隆部長、原谷賢二室長、中根亮室長に感謝致します。

研究を進めるにあたり、物質工学工業技術研究所の野村明室長、新保外志夫技官、佐古猛技官、菅田孟技官、中澤宣明技官、生命工学工業技術研究所の鈴木修所長、中原東郎技官、横地俊弘技官、東海大学工学部生物工学科の平田博文教授、芝浦工業大学工業化学科の根岸章助教授、化学品検査協会の須藤良久氏、オルガノ（株）の千輪眞氏にお世話になりました。深く感謝致します。

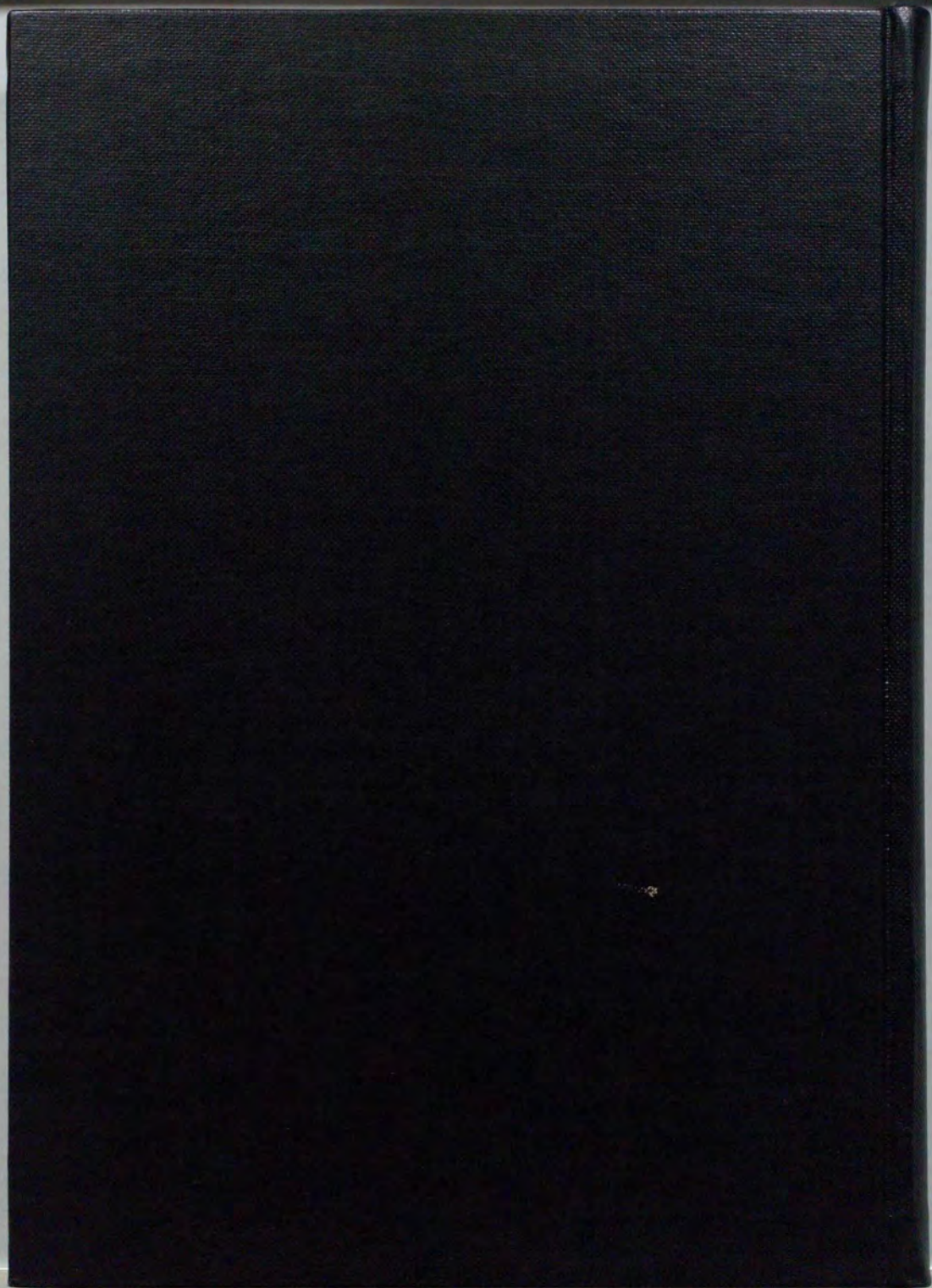
研究を始めるにあたり、ご助言頂きました豊橋科学技術大学平田幸夫助教授に感謝致します。

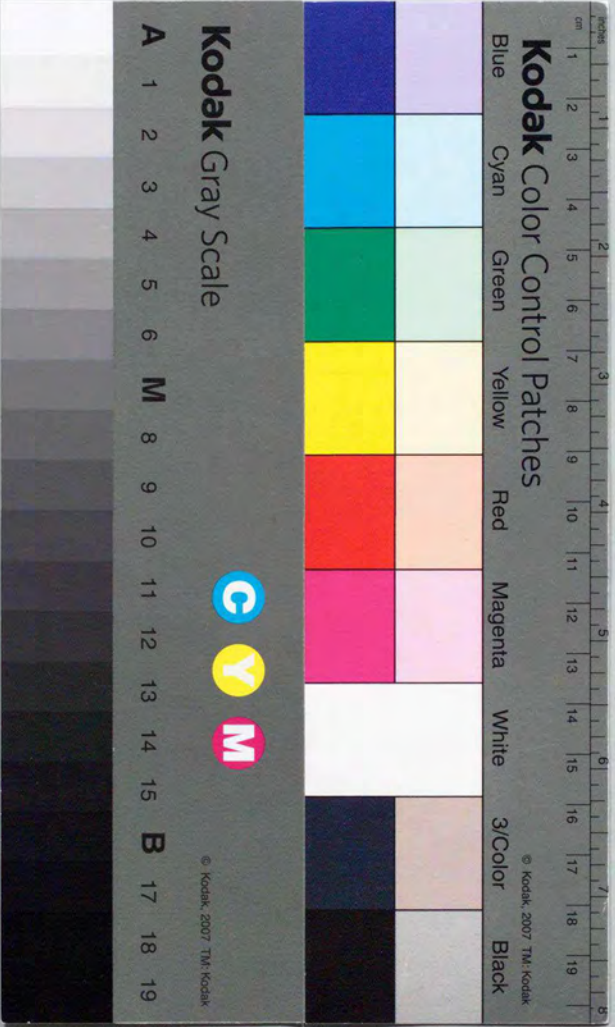
同じ研究室員として活動を共にした、松田正治技官、進藤勇治技官、伊藤直次技官、柳下宏技官、北本大技官、須田洋幸技官に感謝致します。

また、実験面で協力頂きました芝浦工業大学の金子雅一君、山根すみ代さん、飯田勲君、豊田耕三君に感謝致します。

平成6年12月

榊 啓二





# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

# Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak