

TECHNORIDGE

2010 288



特集

技術支援

クロマトグラフィー

TECHNORIDGE

2010 288



写真：除虫菊

- 2 巻頭言
- 3 薄層クロマトグラフィー
- 4 高速液体クロマトグラフィー
- 5 燃焼分解イオンクロマトグラフィー
- 6 ガスクロマトグラフィー
- 7 蚊取線香を題材に
- 8 設備機器紹介

進化を続ける「クロマトグラフィー」

「クロマトグラフィー」・・・科学に携わる方であれば、一度は耳にされたことがある言葉ではないでしょうか。化学大事典によると、「試料成分の2相間への分布の差異を利用して、多成分混合物から各成分を分離分析する方法の一つ」とあり、その歴史は20世紀初頭にまでさかのぼり、ロシアの植物学者ミハイル・ツヴェットによって、ギリシャ語の“色”を表す“Chroma”と“記録”を表す“Graphos”という語を組み合わせることで“Chromatography”と名付けられたとされています。それから約1世紀が経過した現在では、化学品合成の際の確認や天然物からの有用成分の分離には必須の技術となりました。さらに、化学合成品、医薬品や水道水の品質管理、一昨年問題になった中国産冷凍餃子を原因とする薬物中毒事案での原因農薬の分析、加えて電気電子機器中の有害物質のスクリーニングまで、実に様々な分野で使用されています。昨年話題になったテレビドラマでは、主人公の脳外科医が江戸時代にタイムスリップし、炭を使ったカラムクロマトグラフィー（表紙写真中のうちの図柄はカラムクロマトグラフィーによる色素の分離の様子）や和紙を使ったペーパークロマトグラフィーで薬を製造する場面が見られましたが、お気づきになったでしょうか。

ところで、最近、医薬品の分野、特に漢方薬原料の生薬について、より良質なものを提供するため、有効（指標）成分の定性・定量試験などの規格が日本薬局方（医薬品の規範書）中で積極的に設定される方向にあります。製剤中にこれら生薬を多数配合する場合、複雑な天然物の品質管理のために、試料前処理技術の工夫とクロマトグラフィー技術を駆使した分析法の開発が必要です。

医薬品の分野だけでなく、クロマトグラフィー技術の進歩は、これまで分析できなかったものを分析可能にし、得られる情報も増えるのですが、その分、製造管理や品質管理に要求される技術レベルも高くなっているとも言えるのではないのでしょうか。

当センターでは、年間約500件に及ぶクロマトグラフィー関連の受託試験を受けており、最新の技術にも対応できるよう機器整備と分析技術の向上に努めています。本号では、各種クロマトグラフィーについて、実際の分析（応用）例を特集し、最終ページには、本県が生産金額全国一位を誇る夏の風物詩、「蚊取線香」を題材に分析した例を掲載しています。クロマトグラフィーは古くから確立されている技術ですが、日々進化しており、その古典的な手法から最新の手法まで知っておくと便利な「ツール」として利用できます。今回の特集が今後の製品開発や製造品質管理の手法のヒントとなれば幸いです。

＜ご意見用メールアドレス：technori@wakayama-kg.go.jp＞

確かな分析技術で

製品製造・品質管理を支援いたします



編集担当
いしはらりえ
石原理恵

薄層クロマトグラフィー

薬事産業部 則藤真理子

はじめに

クロマトグラフィーの原理は、試料成分が移動相の流れによって固定相の表面又は内部を通過する過程で分離されることによります。シリカゲルなどの吸着剤を平板上に塗布した薄層板を固定相に用いる方法が薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography : TLC) です。薄層板に試料溶液をスポットし、展開容器中で、薄層板の一端を移動相となる溶液に浸すと、試料の移動する速度に違いが生じ、それぞれの成分に分離することができます。TLCは、物質の確認又は純度の試験、精製などに用いられています。

今回は、薬事産業部での主な利用目的である医薬品等の規格試験のうち、成分の確認試験に TLC を用いた例を紹介します。

試料前処理方法の工夫

漢方製剤に使用される生薬であるウヤク、ビャクジュツ、カンゾウを混合した試料より、適当な前処理を加えることでビャクジュツの確認試験を設定できるようになった例を示します。

試料 (ビャクジュツ+ウヤク+カンゾウ)、標準物質 (ビャクジュツ)、ブランク (ウヤク+カンゾウ) について、図1のように操作を行い、前処理をしていない試料溶液 A、標準溶液 B、ブランク溶液 C 及びカラム前処理済みの試料溶液 D、標準溶液 E、ブランク溶液 F を得て、これらにつき、TLC を行いました (展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル混液 (1:1)、検出法:水/硫酸混液 (3:1) を噴霧し、100℃で10分間加熱後、紫外線 (主波長 254nm) 照射)。前処理を行っていない試料溶液 A ではビャクジュツ由来の目的スポットは他のスポットと重なり確認できませんが、前処理を行った試料溶液 D については、標準溶液 E と同じ

位置にビャクジュツ由来の目的スポットとして青色蛍光が確認できました (図2)。このように前処理技術を工夫することにより、そのままでは分離できなかった成分を分離できるようになります。

薄層板の製造会社による分離の違い

また、TLC に使用する薄層板は、同一条件で展開しても製造会社により分離に差が出る場合があります。3社 (A社、B社、C社) の薄層板 (シリカゲル) を用いて、成分αと成分βの混合溶液を試料として、同一条件でTLCを行いました。その結果、A社の薄層板では2つの成分を分離することができませんでしたが、B社及びC社では分離できました。しかし、B社とC社では、成分のRf値*に差が見られました (図3)。

日本薬局方に収載の試験には、「薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板」との記載のみで製造会社の指定がないため、製造会社を変更することで、分離できなかった目的成分が分離可能となる場合もあります。また、カラムクロマトグラフィーのための条件設定の予備分析などに利用の際には、製造会社による違いを考慮して薄層板を選択する必要があると思われます。

おわりに

薄層クロマトグラフィーは、高価な機器も必要なく、簡単な操作で、短時間で定性分析をすることができます。今年度の日本薬局方研究会では TLC (日本薬局方対応) の実技も予定しています。興味のある方は薬事産業部にお問い合わせください。

* Rf 値 : (原線からスポットまでの 距離) / (原線 から溶媒先端までの距離)

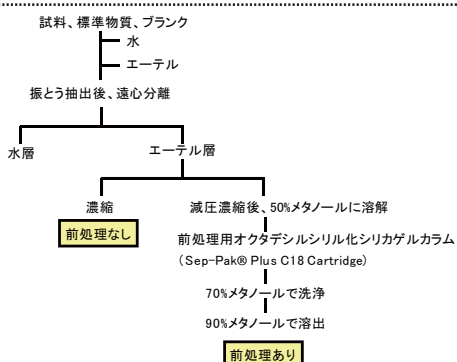


図1 試料調製方法

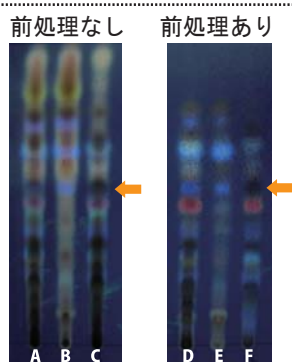


図2 前処理の有無による分離の違い

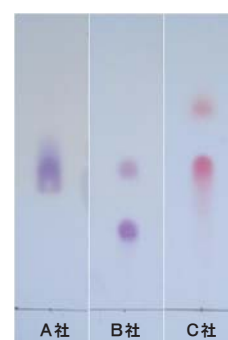


図3 製造会社による分離の差

高速液体クロマトグラフィー

化学産業部 有機化学グループ 多中良栄

はじめに

高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) とは、移動相とよばれる液体を高速で固定相である分離カラムに通して混合物の成分を分離し、各種検出器で検出する手法です。有機化合物や高分子、生体系分子、無機イオン等の定性、定量、分取等に用いられます。試料が移動相の溶媒に溶解している必要がありますが、カラムの種類 (順相、逆相、分子ふるい型、イオン交換等) や、移動相、検出器を選択することにより幅広い試料に対応できる分析手法です。HPLCにおいては、分離すること (カラム、移動相の選択) と、検出すること (検出器の選択) が重要となります。本ページでは有機化合物の分析について検出の方法を中心に紹介いたします。

見えるもの・見えないもの

有機化合物分析の代表的な検出器には、紫外可視吸光度検出器 (UV-Vis)、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)、屈折率検出器 (RI)、蒸発光散乱検出器 (ELSD)、質量分析計 (MS) 等、それぞれ検出原理の異なる検出器があります。

例えば、UV-Vis 検出器は、紫外可視の波長領域での吸光度を検出するものです。比較的多くの化合物に対応できますが、設定した波長に吸収をもたない化合物は検出できません。ELSD は移動相の溶媒を蒸発し微粒子化した化合物の散乱光の変化を検出します。UV-Vis で検出できないものも検出できますが、溶媒と共に蒸発してしまう低沸点の化合物は検出できません。MS では化合物をイオン化しそれを分子量として検出します。したがってイオン化しない (しにくい) 化合物は検出できません。

分析する混合物の成分が既知の場合、その化合物に適した検出器を選択する必要があります。また、未知の化合物を分析する場合には、複数の検出方法で確認することをおすすめいたします。

分析例紹介

p-ヒドロキシ安息香酸メチル (成分 A) と *n*-カプリル酸 (成分 B) の混合物の分析例を紹介いたします。UV-Vis 検出器の 254nm で検出すると、保持時間 3 分に成分 A が検出されました (図 1)。2 成分の混合物の分析ですが、UV-Vis では 1 成分のみしか検出されていません。同じ分離条件で検出器を全波長領域の検出ができる PDA にすると (図 2)、成分 A に加えて、保持時間 5 分にも短波長に吸収をもつ成分 B が確認できました。また、同様に MS で検出したクロマトグラムを図 3 に示します。保持時間 3 分と 5 分に 2 種類のピークが確認できました。イオン化の違いにより成分 A より成分 B の方が大きなピークとして検出されています。また、それぞれのピークのマススペクトルでは、各成分の [分子量-H] の質量数も確認できます。

成分が未知のサンプルを分析する場合には、PDA や MS 検出器はある保持時間に成分が「ある」という情報だけでなく、その成分の吸収スペクトルや MS スペクトルに関する情報が得られる有用な検出器であるといえます。またさまざまな検出器においてピーク面積の大小が各成分の量をそのまま反映するとは限らないことにも、充分留意しておく必要があります。このように試料や目的に応じて、検出器をはじめカラムや移動相なども適切なものを選び出し HPLC を幅広く活用していけるようお手伝いできればと思っております。

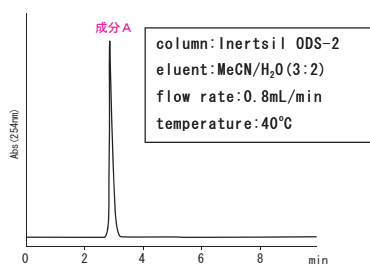
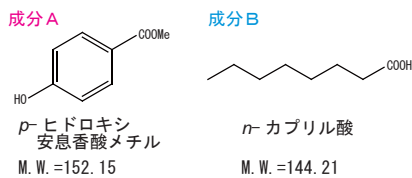


図 1 UV-Vis (254nm) のクロマトグラム

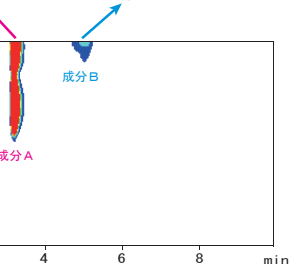
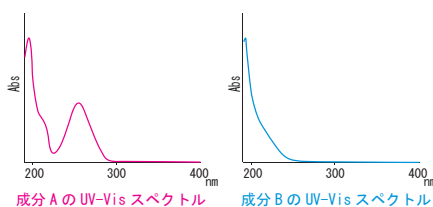


図 2 PDA での検出

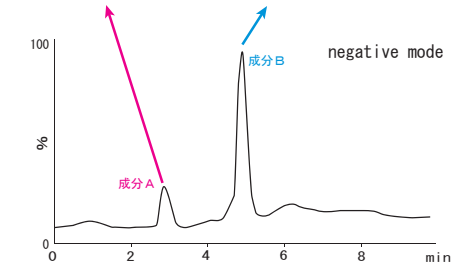
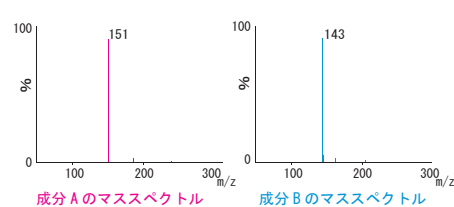


図 3 MS での検出

燃焼分解イオンクロマトグラフィー

化学産業部 分析化学グループ 松本明弘

はじめに

イオンクロマトグラフィーは、イオン成分の同時分離計測を可能とする高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の一種であり、産業廃水を含む様々な環境水の水質管理に適用されています。この方法は、無機の陰イオンおよび陽イオンをイオン交換により分離 (分離カラム) 後、溶離液除去装置 (サプレッサー) を経由し、検出 (おもに電気伝導度検出器) するように装置化されています。

今回は、グリーン調達には欠かせない電気電子機器の有害物質使用制限 (Restriction of Hazardous Substances : RoHS) 指令等で規制されている有機化合物中の臭素化合物 (臭化物イオンとして) の分析法とその操作についてご紹介します。

自動燃焼装置の必要性と操作性

グリーン調達では、規制対象物質 (ポリ臭素化ビフェニル : PBB、ポリ臭素化ジフェニルエーテル : PBDE) が含まれていないことを示さなければなりません。一般的にこれらの物質を精密に測定するためにはガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) が使用されています。しかし、簡易な精密分析法として、イオンクロマトグラフィーで臭素を定量する方法もあり、原料に臭素化合物を含有していない製品については、この方法を適用することができます。

臭素は揮発性の元素であることから開放系で材料を加熱したり、酸分解したりすると揮散してしまって正確な量を測ることができません。そのため、有機化合物中の臭素等の濃度を測定する方法として、酸素フラスコ燃焼 (図 1) - イオンクロマトグラフィーを当センターでは適用してきました。この方法は、微量の試料を紙で包み、フラスコ容器の栓から容器半ばまで突き出た白金に取り付け、予め酸素を飽和状態にしたフラスコに吸収液で臭素を捕集す

る手法です。紙に点火してすばやく栓をはめ、栓を下にして燃焼が終わるのを待ち、その吸収液をイオンクロマトグラフで測定します。このフラスコは燃焼装置と比較すると安価ではありますが、操作における試験環境と熟練度による測定値のばらつきが課題となっていました。自動燃焼装置の導入により、その課題が解消されました。操作は以下のとおりです。まず、試料約 0.1 g を専用ボート上に採取し、オートサンプラーに並べます。試料を約 1 時間、最高 1000°C まで徐々に加熱し、完全燃焼させます。キャリアガスには、空気洗浄装置 (JIS 燃焼乾式空気法) により浄化された空気を用いています。燃焼時、気化した臭素等は吸収液 (純水) に捕集されます。捕集液でイオンとして存在する臭化物イオン等をイオンクロマトグラフに導入 (カラム : IonPac AS18、溶離液 : KOH) し、測定します。その分析例として、4-クロロベンゼンスルホン-2-ブロモ-4-フルオロアニリド ($C_{12}H_8O_2NFC1BrS$) を本装置で測定したクロマトグラムを図 2 に示します。結果より、塩化物、臭化物および硫酸イオンの各ピークが保持時間 5.2、9.4 および 10.5 分のところに検出されました。

おわりに

本装置は、平成 21 年度財団法人 JKA の自転車等機械工業振興補助事業により「自動燃焼装置付イオンクロマトグラフシステム」として設置されました。これまでは受託試験において、蛍光 X 線分析によるハロゲンの定性分析のみを行っていましたが、この装置の導入により、定量まで行えるようになりました。ぜひ、固体試料中に含有する約 50 mg/kg から数%の塩素、臭素および硫黄分の定量にご利用ください。

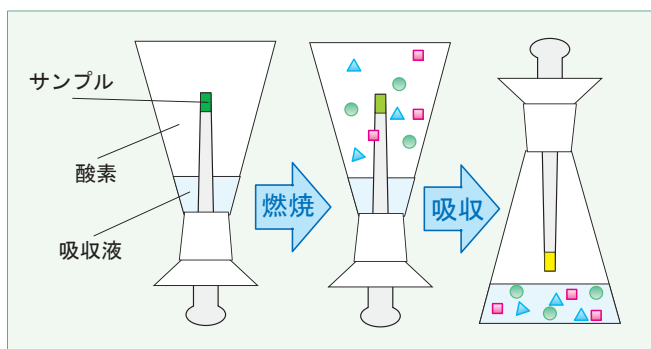


図 1 酸素フラスコ燃焼法

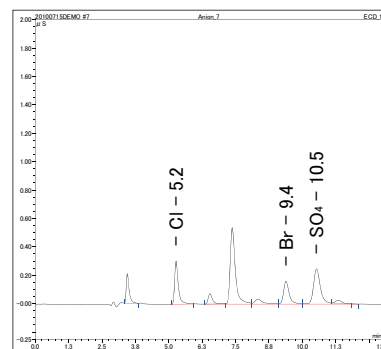


図 2 4-クロロベンゼンスルホン-2-ブロモ-4-フルオロアニリドのクロマトグラム

ガスクロマトグラフィー

化学産業部 分析化学グループ 大崎秀介

はじめに

ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography: GC) は、気化された試料をキャリアガス (不活性ガス) と共に分離カラムに運び、目的成分を分離・同定する分析法です。本ページではその原理については省きますが、分離性能が高く、短時間で各成分の分析が可能、ランニングコストが安価、優れた検出器が多いなどの特徴を持ちます。そして、目的に応じて多彩な条件を設定できるので適応範囲が広く、様々な分野で使用されています。

近年では、分離分析に優れるものの定性能力に欠ける GC と、定性・定量には優れるものの分離能力に欠ける質量分析法 (Mass Spectrometry: MS) を組み合わせた GC-MS 装置が広く利用されています。それぞれの長所を併せ持つ GC/MS は、GC によって分離された成分を MS 部分に導入しイオン化させ、目的成分のマスペクトルを得ます。このマスペクトルは化合物の分子量はもとより、その物質の部分構造に関する大量の情報を含んでいるため、スペクトルを解析することで化合物の構造を推定することができます。

様々な試料形態に応じた導入法 (前処理装置)

MS を検出器として用いることで未知試料の分析など、様々な試料に対応した分析が可能となります。しかし、場合によってはその性能を十分に発揮することができない状況もあります。そのような時、「より効率良く分離する」、あるいは「より高感度に検出する」ためのノウハウが必要となります。

例えば、分析の目的が化成品 (固体) 中の残留溶

剤の確認だとします。通常、GC/MS 測定では溶液状の試料を装置に導入するため、製品を希釈溶媒に溶かした試料を測定します。その場合、製品中にさえ僅かな量しか存在しない残留成分は、希釈されるためにほとんど検出されなくなります (図 1 (a) インジェクション)。このようなケースでは、固体 (液体) 試料の揮発成分を直接装置に導入することができるヘッドスペース法 (図 2) を利用することで、残留成分のピークをハッキリと高感度に検出することができます (図 1 (b) ヘッドスペース)。

このように、試料の形態・状態に応じて最適な導入法を選択することで、より効率的な分析結果を得ることができます。前処理技術として、ヘッドスペース法の他にも、熱分解法、ページ & トラップ法、スターバー抽出 (Stir Bar Sorptive Extraction: SBSE) 法など様々な試料導入法があり、当センターではそれらアプリケーションを搭載した GC-MS 装置を配備しております。

おわりに

GC は、様々な測定用途に合わせて広範囲に対応できる分析手法ではありますが、あくまで揮発成分が測定対象であり、不揮発性の物質や測定中に熱分解などで変質する物質などは直接分析することはできません。熱的に不安定、誘導体化したくない、同族体で沸点の差があまりない化合物は、HPLC を使用した方が比較的容易に分離できる場合もあります。このように、クロマトグラフィーにおける分析では、試料・目的に応じた“ケース by ケース”での対応が必要となります。

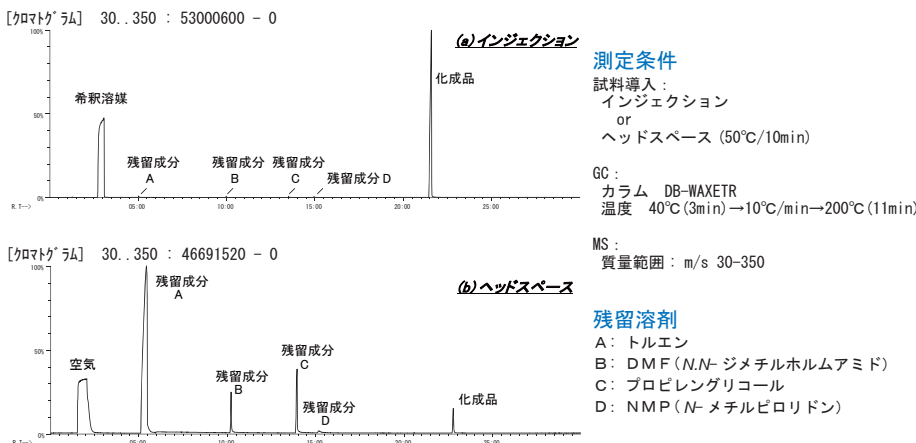


図 1 残留溶剤を含む化成品の GC/MS クロマトグラム

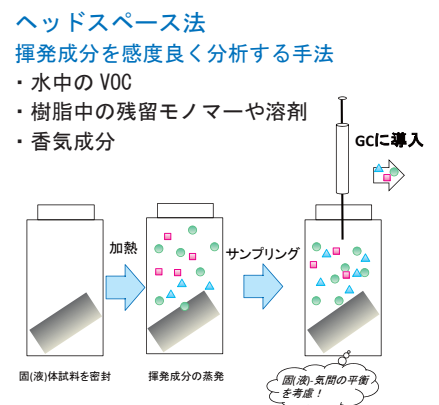


図 2 ヘッドスペース法

蚊取線香を題材に

薬事産業部 石原理恵

はじめに

これまでのページで紹介した技術を使って蚊取線香を分析するとどのようなことがわかるのでしょうか。蚊取線香は、和歌山県が発祥の地で、生産金額は全国シェアの約 45%を占めています。有効成分が合成ピレスロイド (d1・d-T80- アレスリンなど) の蚊取線香 (以下、線香 (合成)) と除虫菊中の成分 (総ピレトリン) の蚊取線香 (以下、線香 (天然)) に大別することができます。蚊取線香は医薬部外品として取り扱われるため、承認書に基づく品質管理が必要で、有効成分については、TLC による確認試験や GC による定量試験が採用されています。今回は、通常の試験とは異なる方法で、各種クロマトグラフィーを実施してみました。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

通常 GC により定量される線香 (合成) の有効成分 (d1・d-T80- アレスリン) を、今回 HPLC により分析を行ってみました。その結果、GC では 1本のピークとして得られる「有効成分」が、HPLC では 2つの分離したピークとして得られることが分かりました (図 1 (a) の緑色ピーク)。これは「有効成分」に幾何異性体が存在するためと推察されます。両ピーク面積の合計から算出した定量値は、製造メーカーの異なる 3 検体で、GC により算出した定量値とほぼ一致しました。さらに詳細な分析法バリデーションは必要ですが、HPLC でも「有効成分」を定量できる可能性があることが分かりました。

線香 (天然) を HPLC で分析しますと、有効成分が 6つの主要なピークとして検出されました (図 1 (b) の黄色ピーク)。これは、総ピレトリンが置換基の違いによる 6 種類の化合物の混合物であるためです。HPLC を総ピレトリンの定量分析に用い

るためには、最適な測定波長や各成分の溶出順の決定などさらなる検討が必要です。

ガスクロマトグラフィー (GC)

蚊取線香の有効成分は、燃焼部分ではなく、燃焼部分から少し手前 (6~8 mm) の約 250°C のところから煙と一緒に空中に広がっていきます。ヘッドスペースを用いた GC/MS でこの現象は確認できるのでしょうか? 線香 (合成) 及び線香 (天然) を用いて、100°C または 200°C で揮発する成分を測定してみました。その結果、線香 (合成) 及び線香 (天然) で、100°C では有効成分は確認できませんが、200°C では、線香 (合成) でアレスリンと推定されるピークが確認でき (図 2 (a) の緑色ピーク)、線香 (天然) でもピレトリンと推定される 2本のピークが確認できました (図 2 (b) の黄色ピーク)。このように、蚊取線香の有効成分は、普通の保管状態では拡散していくことはありませんが、線香が燃焼して温度が上昇することにより空气中へ拡散していくことが確認できました。

おわりに

見ていただいたように同じ試料でも使用するクロマトグラフィーによって得られる情報は様々です。当センターでは、蚊取線香に関しては定性・定量以外の分析はほとんど実施していませんが、今回ご紹介した GC を応用して、保管状態の違いや保管年数の経過による有効成分の拡散状態の情報を得ることもできます。もちろん、蚊取線香だけでなく、新しい情報を得たい時や様々な製品の品質管理、製品開発にはクロマトグラフィーが力を発揮してくれると思います。今回の特集以外にも対応できることがあると思いますので、ぜひ、お気軽にご利用・ご相談ください。

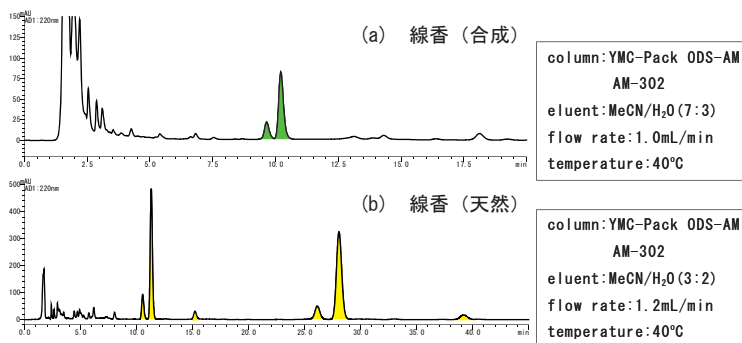


図 1 蚊取線香中の有効成分の HPLC クロマトグラム

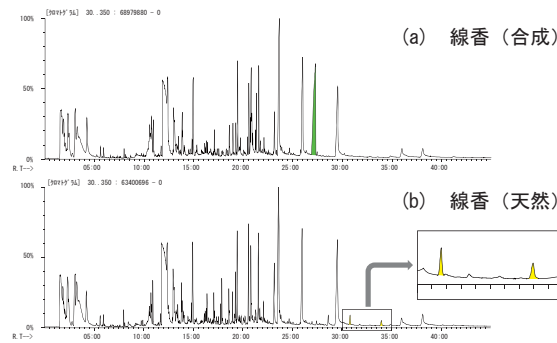


図 2 蚊取線香中の有効成分の GC/MS クロマトグラム
column: DB-WAX, temperature: 40°C (3 min) → 10°C/min → 220°C (9 min)

設備機器

電源立地地域対策交付金

機器名：光造形装置

この設備の仕様は？

製品名：NRM-6000

メーカー：シーメット株式会社

この設備の特徴・用途は？

- 光硬化性樹脂の液面に紫外線レーザーをスキャンし硬化させます。硬化物を沈めながら順次積層硬化することで造形する原理です。
- 高出力固体レーザー（1500mW、120MHz）とダイナミックフォーカス、デジタルスキャナにより高速で造形し、短納期で対応ができます。
- 射出成形部品だけでなく、肉厚の薄いブロー成形やシート成形のモデルも高精度に造形できます。
- 最大造形サイズ：600mm×600mm×500mm

この設備を利用するには？

詳しくは、機械金属産業部 機械造形グループまでお問い合わせください。



上：光造形装置 下：造形物

設備機器

電源立地地域対策交付金

機器名：フルカラー3Dプリンタ

この設備の仕様は？

製品名：フルカラー3Dプリンタ Z450

メーカー：Zコーポレーション

この設備の特徴・用途は？

- 3次元CADやCGデータを元に、立体形状を作ることができます。
- 石膏を材料として立体モデルを造形し、形状はもとより、色や柄を表現することができます。
- プラスチック成型品の試作モデルなどをはじめ、様々な用途に活用頂けます。
- 最大造形サイズ：203mm×254mm×203mm

この設備を利用するには？

詳しくは、機械金属産業部 機械造形グループまでお問い合わせください。



フルカラー3Dプリンタ

試作例



設備機器

電源立地地域対策交付金

機器名：パルパーフィニッシャー

この設備の仕様は？

製品名：2段階パルパーフィニッシャー HC-PF

メーカー：株式会社 サンフードマシナリ

この設備の特徴・用途は？

- 農産物の裏ごしと仕上げ（繊維等の分離・除去）を連続的に行う装置です。
- 果皮や種を一段目のパルパーにてろ過し、二段目のフィニッシャーで繊維などを裏ごしします。
- 加工例としてピューレ、ジュース、ジャム、濃厚ソース、きんとん、ルウ等があります。（処理能力：200～300kg／時間）

この設備を利用するには？

詳しくは、食品産業部までお問い合わせください。



加工例 ミカンジュース



上部より原料を投入すると



繊維のみ除去できる

技術情報誌
編集・発行／和歌山県工業技術センター
和歌山市小倉60番地

発行日／2010年8月27日
TEL／073-4777-1271
FAX／073-4777-2880

印刷／株式会社 協和
住所／海南市南赤坂5-3-1
TEL／074835211