

実験 - 3 分離分析

分離操作は分析の基本である。分離を広く考え、特定の物質にだけ作用させることや特定の物質からの応答を抽出することまで一種の分離操作であるとみなせば、分析とは分離であるといえる。通常、分離分析は物質そのものを構成単位に分離し、かつ分析する方法を指す。ここではその原理と特徴を学ぶ。

物質を成分に分離する場合、砂鉄を磁石で分離するように物質固有の性質の違いを利用する。分離分析で使用される性質には沸点、異種溶媒間の分配、溶解度、吸着、静電引力、親和性などがある。また分離技術として分類すると、蒸留、溶媒抽出、沈澱生成、クロマトグラフィー等がある。本実験では、(A) 溶媒抽出による目的物質の定量、及び(B) ガスクロマトグラフィーによる定性・定量分析を学習する。

【実験3(A)】 マスキングと抽出分離による鋼中の銅の定量

3(A).1: 解説

3(A).1.1: 溶媒抽出

溶媒抽出は互いに不溶な溶媒間に溶質が偏って分配する現象を利用した物質分離法であり、生体中の微量成分の分離濃縮から、金属の湿式精錬など工業的規模での分離にいたるまで広く使用されている。通常溶媒抽出用の溶媒としては水と有機溶媒が用いられ、主としてイオン性の化合物が水層に、中性で疎水性の物質が有機層に抽出される。本実験では分析化学の分野で溶媒抽出法が最も多く利用されている金属イオンの分離を行い、その操作、加えられる試薬の役割などを学ぶ。

溶媒抽出では、溶質が複数の溶媒間に分配される平衡の偏りの大きさが重要である。ある化合物SのA - B相間の分配比 D を以下のように定義する。

$$\text{分配比 } D = \frac{\text{B相中のSの全濃度}}{\text{A相中のSの全濃度}}$$

B相への抽出は分配比 D が大きいほど起こりやすいことになる。ここで水相から有機相への抽出を考える。有機相へ抽出されやすい溶質は水よりも有機溶媒に対する親和性が大きいもの、つまり水よりも有機溶媒によく溶けるものである。このような溶質としては中性の分子、無極性分子及び疎水性の分子が適当であり、逆にイオン性の分子、極性分子及び親水性の分子は水和されやすく、有機相には抽出されにくい。したがって目的とする化合物やイオンを有機相に効率良く抽出する(分配比 D を大きくする)ためには、pHの調整、錯形成などの操作により、目的成分を中性分子、無極性分子、疎水性の分子に変えればよい。またその際に溶媒の選択も重要となる。

金属イオンは水中では水分子とアクア錯体を形成しているため、分配比 D は小さい。しかし、金属イオンと強く結合する陰イオン性のキレート剤を添加し、金属イオンの価数を打ち消せば、分配比 D が大きくなる。この場合、キレート剤の性質としては金属イオンとの錯体生成定数が大きい、配位により中性の錯体を生成する、配位数が満足され水分子の配位がない、錯体として疎水性である、ことが要求される。また、共存する他の金属イオンとの分離という観点からは、目的とする金属イオンとの錯体生成定数が特に大きい、あるいは目的とする金属イオン以外では中性錯体にならないなどの性質が求められる。

3(A).1.2: マスキング

キレート剤による抽出分離を補助する目的でマスキング剤や協同効果試薬の添加もよく行なわれる。マ

スキング剤は共存する他の金属イオンと結合し、キレート剤との錯体生成を妨げることにより共存イオンによる影響を除去する。一方、協同効果試薬は配位水分子の置換、錯体の疎水性の向上などを通して目的とする金属イオンの分配比 D を大きくする作用がある。近年のキレート剤、マスクング剤、協同効果試薬の開発が著しい。特にクラウンエーテル等のホスト - ゲスト化合物の開発、ポルフィリン化合物の利用による高感度化等によるキレート剤の選択性、発色能の向上は顕著であり、高機能のキレート試薬が一般にも市販されるようになっている。

3(A).2: 実験

(1) 実験の目的

鉄鋼中の銅の定量において、目的成分だけを選択的に抽出し、定量するとともに、その抽出原理について考察する。具体的には、鉄鋼試料を硝酸と硫酸で分解し、鉄を完全に酸化した後クエン酸を加えて鉄などの沈澱を防ぎ、アンモニア水を加えて塩基性とし、EDTA(エチレンジアミン四酢酸2ナトリウム)によってマンガン、ニッケル、コバルトイオンをマスクしたのち、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムを加えて銅を発色させ、これを酢酸ブチルを用いて抽出し、その吸光度を測定して、あらかじめ作成してある検量線を用いて銅を定量する。

(2) 機器, 器具

- 1) 分光光度計(図1), 振とう器(図2), ホットプレート
- 2) 分液漏斗(容量約200ml) 10本,
20ml ホールピペット 3本,
100ml メスフラスコ 1本,
10ml ビュレット 1本,
メートルグラス, 100ml ビーカー 2個,
測定用ガラスセル2個



図1 分光器の写真

(3) 試薬

- 1) 混酸: 硝酸1 + 硫酸2 + 水10混合液
- 2) クエン酸溶液(20%), 酢酸ブチル, アンモニア水
- 3) エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA) 溶液(1%)
- 4) 鉄溶液(2mg/ml): 硫酸第二鉄アンモニウム8.64gを水200mlに溶解し、これに混酸50mlを加え、500mlに希釈したもの。
- 5) ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC) 溶液(0.1%: 使用時に調製)
- 6) 銅標準液(10 μg/ml): 金属銅(標準試薬)

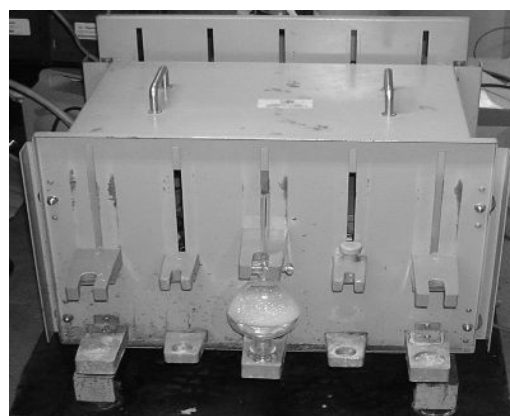


図2 振とう器の写真

1.000gを300mlビーカーにはかりとり、水10ml, 硝酸15ml, 硫酸(1+1)15mlを加えて加熱分解し、硫酸白煙が生じるまで加熱を続ける。冷却後1Lのメスフラスコに移し入れたのち水を標線まで加え、よく振りまぜて原液とし、この原液10mlを水で1Lに正確に希釈する。

7) ニッケル標準溶液(10 μg/ml):原子吸光用標準溶液を100倍に希釈した溶液。

(4) 実験操作

- 1) 試料約0.2gを時計皿に正確にはかりとる。
- 2) これを100mlビーカーに入れ、混酸10mlを加える。時計皿でおおい、加熱分解する。ドラフト内で室温まで冷却する。

この操作は指定されたドラフト内で行うこと。以後の操作は実験機の指定されたダクトの下で行うこと。

溶液が室温まで冷却したらビーカーを実験機まで運び、100mlのメスフラスコに水で洗い移し、標線まで水を加えてよく混合する。これを試料原液とする。

- 3) 試料原液を20mlホールピペットを用いて、2本の分液漏斗に正確に20mlづつ分取する。

- 4) 3)の2本の分液漏斗にクエン酸溶液(20%)20mlを加えて混合し、アンモニア水10mlを加えて十分混合する。

- 5) 漏斗4)の分液漏斗の片方にEDTA溶液(1%)10mlを加えて混合する。もう片方の分液漏斗にEDTA溶液は加えない。

- 6) つぎに2本の分液漏斗に各自が調製したDDTC溶液(0.1%)10mlを加えて混合する。さらに酢酸ブチル20mlを乾燥した20mlホールピペットを用いて加え、振とう器を用いて3分間激しく振とうさせる。

- 7) 酢酸ブチル相を乾燥ろ紙でろ過し、その一部を分光器用のセルにとり、ただちに酢酸ブチルを対照として適切な波長で吸光度を測定する。(測定波長は、検量線の作成を参照すること)ろ紙は使用ごとに取り替える。使用後のろ紙はその都度ふたのついたゴミ箱に捨てること。

(検量線の作成)

- 8) 鉄溶液を試料分液量に応じ、鉄量近似となるよう(試料0.2gのとき20ml)分液漏斗数本にそれぞれ分取する。

- 9) これに10mlのピュレットを用いて銅標準溶液(0~5ml)を段階的に加える。

- 10) 上記4)~6)の操作により処理する。ただし実験操作5)においてはEDTA溶液を加えたもののみを調製する。

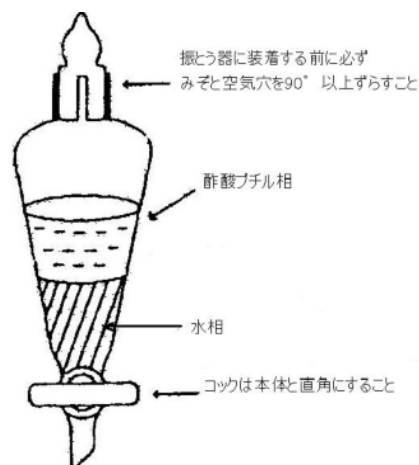


図3 分液漏斗内の液相

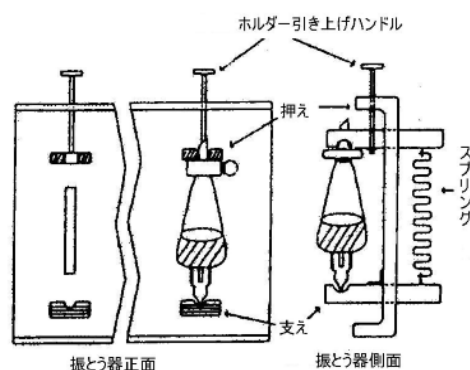


図4 振とう器への分液漏斗の装着

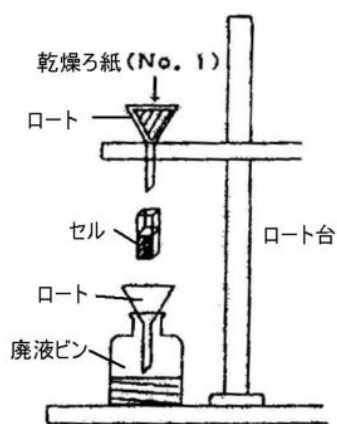


図5 酢酸ブチルのろ過

- 11) 銅標準溶液を5ml加えた試料で銅-DDTC錯体の吸光スペクトルをとり、最も吸光度の高い波長を測定波長とする。なお吸収スペクトルの取り方は、担当者が説明する。
- 12) 銅量と吸光度との関係線を求めて検量線とし、実験操作7)で得た吸光度を挿入して銅量を求め、試料中の銅含有量を計算する。

(ニッケル-DDTC錯体の吸収スペクトルの測定)

- 13) ニッケル標準溶液20mlを、ホールピペットを用いて2本の分液漏斗に移す。
- 14) 片方の分液漏斗に鉄溶液を20ml、クエン酸20ml、アンモニア水10mlを加え、もう片方の分液漏斗にはさらにEDTA溶液10mlを加える。
- 15) 両方の分液漏斗にDDTC溶液10mlを加え、さらに酢酸ブチル20mlを正確に加え、振とう器を用いて3分間激しく振とうする。
- 16) 酢酸ブチル相を乾燥ろ紙でろ過し、その一部を分光器のセルにとり、ただちに酢酸ブチルを対照として吸収スペクトルを測定する。

実験終了後の廃液処理

実験終了後、酢酸ブチル相は茶褐色の酢酸ブチル用の廃液ビンにすべて集め必ず栓をしておくこと。水相(試料原液、調製したDDTC溶液を含む)は実験室中央部のマスキング用の水相用廃液ビンに全てする。実験機等に溶液がこぼれていないことを確かめ、整理整頓後帰宅する。

(注)

1. 酢酸ブチル相に水が混入している場合、肉眼でニゴリが見えなくても高い値を与えることがあるので必ずろ紙で脱水すること。
2. 酢酸ブチルは水に浮くので、まず始めに水溶液部分を捨ててから溶媒部分をセルに取ること。
3. 酢酸ブチル用のガラス器具(ホールピペット・光学セル)に水をつけてしまったときは担当者に至急連絡する。これらの器具は通常の洗浄後メタノール、アセトン等ですすぎ、ドライヤーの冷風で乾燥している。

3(A).3: 結果のまとめと設問

レポートには、各自の結果をまとめ、下記の設問を中心に考察せよ。

(設問)

- A) 銅量と吸光度が比例関係にあるのはなぜか。
- B) EDTAを加える前にアンモニア水によりpHを高く調製する理由を考察せよ。なお、EDTAの酸解離について、 $pK_{a1}=2.0$ 、 $pK_{a2}=2.7$ 、 $pK_{a3}=6.2$ 、 $pK_{a4}=10.3$ である。
- C) 鉄鋼を溶解した試料にクエン酸を加えずにアンモニア水を加えた場合、沈殿が生じる。沈殿物は何か？
- D) 鉄イオンは本実験の観測対象ではないが、主成分である鉄イオンを沈殿させないようにクエン酸を加える理由を考察せよ。
- E) 本実験ではクエン酸、EDTA、DDTCが金属イオンに配位し、錯体を形成する。錯体の安定度定数の大小関係を実験結果に基づき推定し、銅だけが選択的に抽出される機構について考察せよ。

F) 本実験のEDTAを加えたものとそうでないものの誤差について考察せよ。なお、各自に与えられた試料中には銅以外の重金属元素が以下の量含まれている。また、Niは各自が分析した吸収スペクトルを示し、Cr及びMnは440nm付近では吸収を示さない。

表1 鉄鋼試料中の重金属含有量(%)

試料番号	Ni	Mn	Cr	Co
501 - 4	0.062	0.490	1.040	未検出
502 - 5	0.050	0.700	1.010	未検出
513 - 4	0.130	0.630	0.710	未検出
514 - 4	0.190	0.760	1.070	未検出

(参考書)

JIS G 1219-1963 鉄および鋼中の銅定量方法

入門キレート化学 上野景平 p86, 南江堂

日本化学会 実験化学ガイドブック p728~, 丸善

【実験3(B)】 ガスクロマトグラフィーによる物質の分離定量

3(B).1:解説

3(B).1.1:概要

クロマトグラフィー(chromatography)という言葉は“色(chroma)”と“書く(graphos)”という言葉が組み合わされたものである。これは初期の研究において葉緑素などの色素の分離に用いられたことに由来する。試料を含む流体(移動相, mobile phase)を不溶性の物質(固定相, stationary phase)の隙間に通すと、試料によって固定相への分配や吸着力がそれぞれ異なるために移動相中にある時間の比率に差が生じ、結果として移動速度に違いが生じて相互に分離される。近年は検出技術や充填剤の進歩によりクロマトグラフィーの性能向上が特に著しく、化学研究になくてはならないものになっている。ほとんどのクロマトグラフィーで複数の検出法があり、分析対象により適切な組合せが選択できるようになっている。最近では質量分析装置、赤外吸収法などの分光測定装置との組合せにより、高度な成分分析が可能となっている。

移動相の違いによってクロマトグラフィーは次のように分類される。

(a)移動相による分類

- ガスクロマトグラフィー(GC)
- 液体クロマトグラフィー(LC)
 - カラムクロマトグラフィー
 - ペーパークロマトグラフィー(PC)
 - 薄層クロマトグラフィー(TLC)
- 超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)

現在主流となっているカラムクロマトグラフィーでは長い管(クロマトグラフィー管)中に固定相として充填剤(packaging)をカラム(円柱,column)状に詰め、一方の入り口から試料を導入する。試料を気体あるいは液体により流していくと、試料に含まれる分子は充填剤に吸着されたり、あるいは充填剤表面に塗布された液体に溶け込んだりしながら“帯(band)”または“ゾーン(zone)”を形成してカラム内を移動してゆく。分離された試料の帯はカラムから出ると配管によって検出器に導かれ、経時的に信号が記録される。時間軸に対して信号強度を記録した図はクロマトグラム(chromatogram)と呼ばれ、試料の帯はピーク(peak)となって現れる。(図6)

分離の原理によって次のような分類も可能である。

(b)分離の原理による分類

- 分配クロマトグラフィー(溶解度)
- 吸着クロマトグラフィー(吸着力)
- イオン交換クロマトグラフィー(静電的相互作用)
- アフィニティークロマトグラフィー(バイオアフィニティー)
- ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(分子サイズ)

クロマトグラフィーと並んで、電気泳動法も特に生体分子の分離法として重要である。原理としてはゾーン電気泳動法、等速電気泳動法、等電点電気泳動法等があり、形態としてはゲル電気泳動法とキャピラリー電気泳動がある。ゲル電気泳動法は核酸やタンパク質のサイズ分離に欠かせない方法である。また、キャピラリー電気泳動法は超微量高速分離法として発展が著しい。今回の実習では電気泳動法は取り上げないが、クロマトグラフィー法と対をなす重要な分離法であるので、原理と方法について各自整理しておかれない。

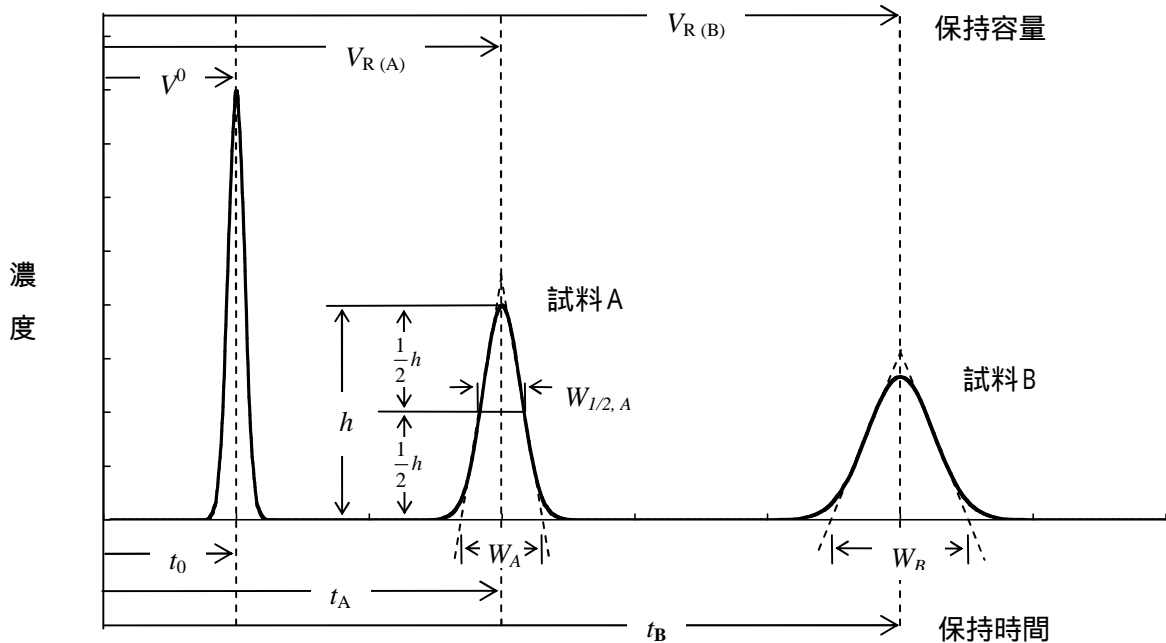


図6 ガスクロマトグラムの例 ピーク幅 W を求めるにはピークの変曲点で接線を引く

3 (B) 1.2: クロマトグラフィーにおける保持と分離効率

クロマトグラフィーは原理から考えて溶媒抽出の応用とも考えられる。分子は移動相から固定相に分配比に応じて溶媒抽出され、一定時間滞留する。その後移動相に戻り移動する。この過程を繰り返し移動速度が変わることから、固定相への分配比が大きい程遅くなることが分かる。クロマトグラフィーを多段階の溶媒抽出として取り扱う理論を段理論という。段理論によればカラムから出てくるまでの時間、ピークの広がりそれぞれ分配係数、カラムの理論段数(仮想的な溶媒抽出の段数)の関数として記述できる。

今、全体の流量を F (ml/min), 全く分配されない仮想的分子がカラムの出口に達する時間を t_0 (min) とすると、充填剤を除いたカラムの移動相体積 V^0 (ml) (空隙体積、ホールドアップ体積とも呼ばれる) は、

$$V^0 = t_0 F$$

で表わされる。一方、実際の試料分子が t (min) 後にカラムの出口に到達したとすれば、その分子に対しては tF (ml) の容量のカラムに相当する。この容量を保持容量 (retention volume) V_R (ml) といい、 t を保持時間 (retention time) という。この時、試料分子は移動相中に t_0 , 固定相中に $(t - t_0)$ だけ保持されたことになるため、固定相への分配比に相当する量として、

$$k = \frac{t - t_0}{t_0}$$

が定義できる。この k を保持比 (retention factor または capacity factor) といい、原理的に移動相と固定相における濃度比を表す分配平衡定数に比例する量である。 k を用いると、 V_R は V^0 と k により以下のように記述される。

$$V_R = tF = V^0(1 + k)$$

充填剤の種類により、分子と固定相間の分配平衡が変わるので、 k は当然変わるが、充填剤の種類が同じであれば、各分子に対する k の相対的な値、相対保持比は一定となる。充填剤の種類が同じでもカラムへの詰め方によって固定相体積と移動相体積の比が変わると k は変化する。

クロマトグラフィーの分離効率の理論に関しては段理論と速度論がある。段理論ではカラムを仮想的な段 (分液漏斗と考えるのがわかりやすい) が複数個直列に連なったものとする。一つの段中では完全に分配平衡が成立し、単位時間後に移動相のみが次の段に移動するものとして、カラム中の物質の移動を考える。このように仮定するとカラム中の物質は二項分布になり、ピーク幅の広がりが説明できる。段理論によれば、ピーク幅 W は理論段数 (カラム中の段の総数) N を用いて以下のようにあらわされる。

$$W = \frac{4t}{\sqrt{N}}$$

理論段数が大きい程、ピークの広がりは小さく、分離が良い。理論段数はカラムの性能の尺度として用いられる。

段理論によれば、分配比と保持時間の関係、ピークの広がりとの関係は説明できるが、充填剤の大きさや移動相の流速の影響は評価できない。速度論では段理論で考えた仮想的な段の大きさが充填剤の大きさや移動相の流速によって影響されると考える。例えば、流速が極端に遅い場合、カラム内の物質は拡散により広がってしまうであろう。広がり大きさはカラム内の滞留時間、すなわち流速の逆数に比例する。これ以外にも流速に比例する項 (平衡からのずれ) と流速に依存しない項 (流路の違い) があるため、理論段高 (一段の長さ) H は、流速 u の関数として以下のようにあらわされる。

$$H = Au + \frac{B}{u} + C$$

この式は van Deemter の式と呼ばれ、図9のような曲線となる。これによって分離に最適な流速を知ることができる。A, B, Cの詳細については参考書を参照すること。

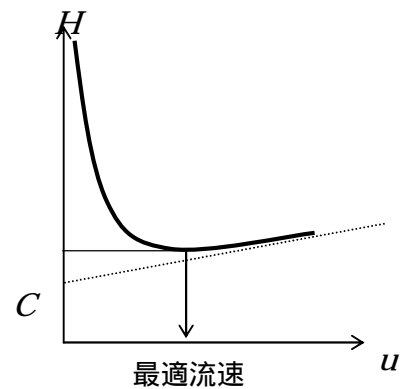


図9 理論段高と流速の関係 van Deemter のプロット

3(B)1.3:ガスクロマトグラフィーの原理と装置構成

図7と図8に、クロマトグラフィー装置(クロマトグラフ)の外観及び基本構成を示す。分離カラムは一定の大きさにそろえた粒子の表面に難揮発性の液体(固定相液体という)を塗布した充填剤からなっている。高圧ボンベから一定の流速でキャリアーガスを流しておき、その中に試料導入部から試料を注入する。試料導入部は試料の沸点以上に加熱されているので注入された試料は速やかに気化し、キャリアーガスによって分離カラムに運ばれる。試料がカラム中を通過する間に、試料中の各成分は固定相液体とキャリアーガスとの間で分配を繰り返す。固定相への分配率は試料成分の種類によって異なるので、各成分がカラムを通過する時間に差が生じる。分離された成分は、熱伝導検出器などにより検出されクロマトグラムを得る。固定相液体の種類、キャリアーガスの流速、カラムの温度など実験条件を適当に選ぶことにより、分離を最適化できる。

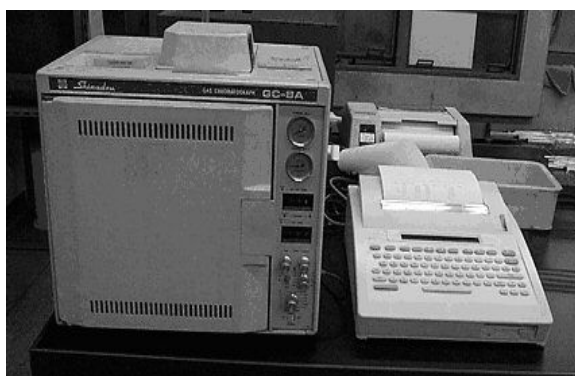


図7 ガスクロマトグラフの写真
左が本体 右が記録計(インテグレーター)

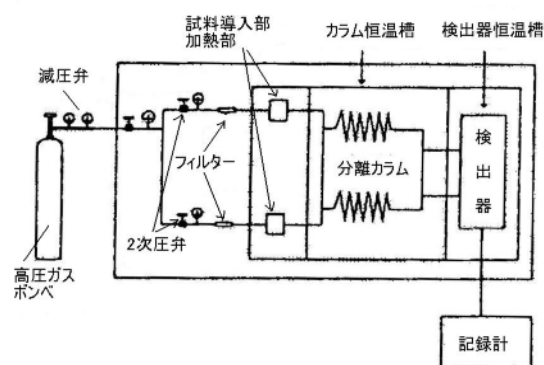


図8 ガスクロマトグラフの概略図

実際のクロマトグラムの例を図6に示す。ガスクロマトグラフィーでは、空気は固定相に分配されないものと考え、空気によるピークの時間を t_0 とする。クロマトグラムをよく見ると、保持時間の長いピークほど幅の広いピークになることがわかる。ピーク幅 (W) は変曲点での2つの接線とベースラインの交わる2点の間隔で表す場合と、半分のピーク高さでのピークの幅(半値幅, $W_{1/2}$) で表す場合とがある(図6参照)。

〔固定相液体〕

固定相液体はそれぞれの目的に合わせたものが市販されており、その内のいくつかを表2に示す。本実験では、無極性液体としてシリコンDC-200(メチルシリコン)、強極性液体としてポリエチレングリコール1500(カーボワックス1500)を使用する。

表2 固定相液体の例 N:無極性, I:中間の極性, P:極性

物質名	代表的な対象試料	極性	使用最高温度()
スクワラン	炭化水素	N	125
アピエゾンL	高沸点炭化水素	N	300
シリコーン油	全タイプ	I	275
カーボワックス20M	アルコール, 芳香族	P	250
メチルシリコン	ステロイド, 殺虫剤	N	300
ポリアミド樹脂	アミノ化合物	P	300

〔GCカラム（充填型とキャピラリー型）〕

GCカラムには充填型とキャピラリー型がある。前者はカラムに担体を充填してそのまま吸着クロマトとして使うのと、この担体にさらに液相を固定して分配クロマトとして用いるのがある。カラム内径は2~4mm程度である。後者は小さな内径のキャピラリー（内径0.25mm~0.53mm）の内壁に液相のみをコートしたもの（WCOT）、内壁に担体を固定しただけのもの（PLOT）、これにさらに液相をコートしたものの3種がある（SCOT）。吸着クロマトでは固体の固定相への吸着と気相への脱着を繰り返すことにより、分配クロマトではカラム内壁や担体に塗布した液相への分配と気相への分配を繰り返すことにより分離が行われる。カラム効率は充填型よりキャピラリー型の方がよい。キャピラリー型のうちでも、内壁に液相をコートしたものの方が内壁に担体を固定したものよりよい。一般に充填型の担体の径はキャピラリー型の担体径より大きい。これらの物理的違いを模式的に図10に示す。

キャピラリーはフューズドシリカでできた外径0.5mm~1mm程度の肉薄のチューブで外面をポリイミドでコートしてあるのでフレキシビリティがあり機械的強度があって取り扱い易い（ポリイミドコーティングのため茶色に見える）。長さは10m~100mにもなるのでコイル状に束ねて用いる。

WCOTは内壁を液相で薄く（1ミクロン程度）均一にコートしたもので、試料負荷容量は小さいがカラム効率は3つのうちで最もよい。SCOTは内壁に支持体（担体）を固定しその表面に液相をコートしたものである。カラム効率はWCOTより若干劣るが試料負荷容量は優れている。PLOTは吸着体を内壁に固定したもので吸着クロマトとして使う。

GCではカラムを高温にして溶質成分を気化またはそれに近い状態にする。吸着クロマトでは完全に気化することが望ましいのでより高温にする。分配クロマトでは必ずしも完全に気化させない。多成分を分離するためにカラム温度を昇温プログラムに従って高温にあげてゆく。分配クロマトで用いる液相には非極性~中極性~極性と多種のものがある。

アルキル（またはフェニル）シロキサン~シアノアルキルシロキサンはシリコンオイル系でアルキル基の種類、数、シアノ基の数で極性が変化する。この他にCarbowaxに代表されるポリエチレングリコール系の液相があり高極性シアノシリコンに比べて極性は低い。中極性シリコン系より高い極性をもつ。本実験のGC-MSで用いるカラムは内径0.25mm、長さ30mのフューズドシリカキャピラリーカラムにポリジメチルシロキサンを内壁コートした（WCOT型）ものである。

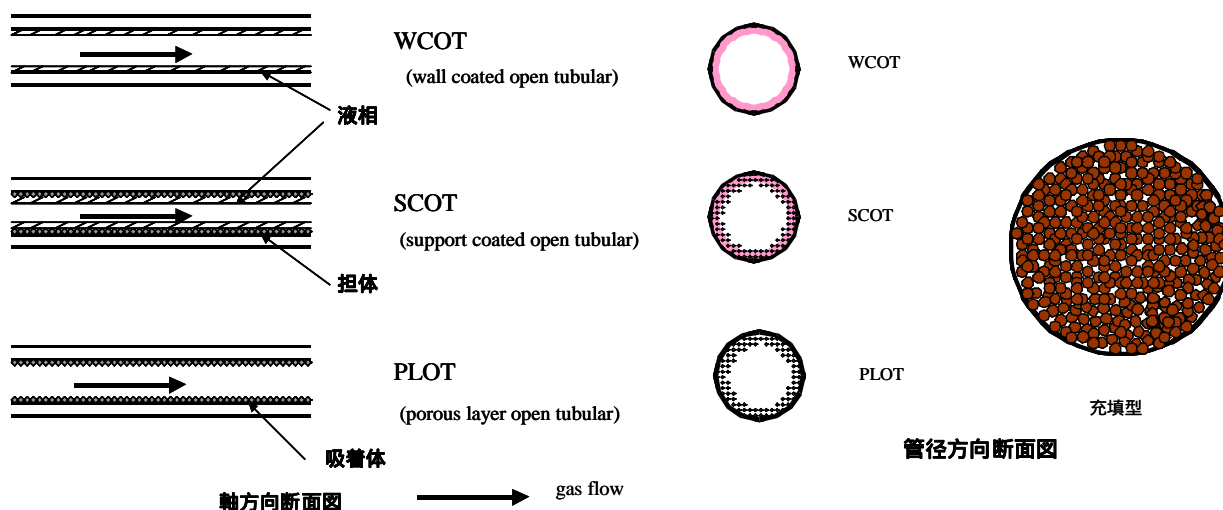


図10 カラム内の構成

(熱伝導度検出器(Thermal Conductivity Detector:TCD)の原理)

この検出器はキャリアーガスのみが流れる対照セルと、カラムで分離された試料を含むキャリアーガスの流れる試料側セル(測定セル)で構成され、図11のような流路から成り立っている。セル中の白金またはタングステンのフィラメントを流れる電流によって生じる熱は、一定の流速で流れているキャリアーガスによってセルの器壁へと運ばれる。

両セル中のフィラメントには熱的な平衡が成立しその温度は一定となり、フィラメントの抵抗値は一定となる。キャリアーガスと共に試料成分がセルに入ると、それぞれの熱伝導率が異なるため対照側と試料側のフィラメントから奪われる熱量が異なり(表3)、その結果それぞれのフィラメントの抵抗値に差を生じてブリッジ回路の平衡がくずれ、その両端に不平衡電位が発生する。これを増幅し、記録計によってクロマトグラムを描く。

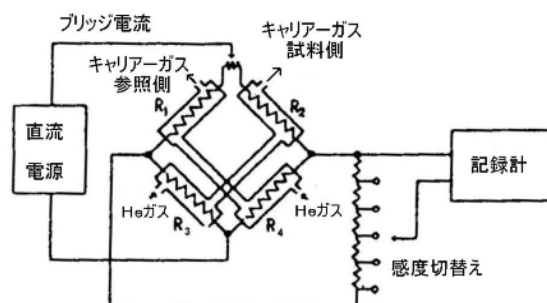


図 11 熱伝導度検出器の概略図

表3 100 における物質の熱伝導度の例 ($k \times 10^{-5} \text{ cal/sec} \cdot \text{cm} \cdot$)

物質名	k	物質名	k
メタン	10.9	ヘリウム	41.6
エタン	7.3	水素	53.4
プロパン	6.3	窒素	7.5
エチルプロピルエーテル	5.4	二酸化炭素	5.3
エタノール	5.3	アルゴン	5.2
n - ヘキサン	5.0	四塩化炭素	2.2
ベンゼン	4.4	酢酸エチル	4.1

〔質量検出器 (Mass detector:MD) の原理〕

イオン分析部 (Mass analyzer) イオンを m/z にしたがって分離する。

磁場による単収束型 (図 12) または分解能をあげるために電場による収束を加えた二重収束型がある。加速電圧を変えることにより m/z の掃引を行う。

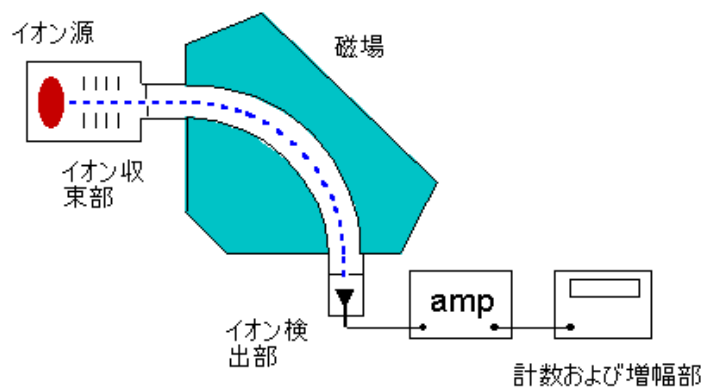


図 12 磁場単収束型 イオン収束部の加速電圧の変化により m/z 掃引が行われる。

この他には四重極型 (Q・ポール型、図 13) がある。図 13 の相対する極に二種の電圧 (直流 u と交流 V_0) をかけると、この間を通過できるのは特定の m/z だけとなる (同調させる)。交流周波数一定下で、 u と V_0 を変えることにより m/z の掃引ができる。

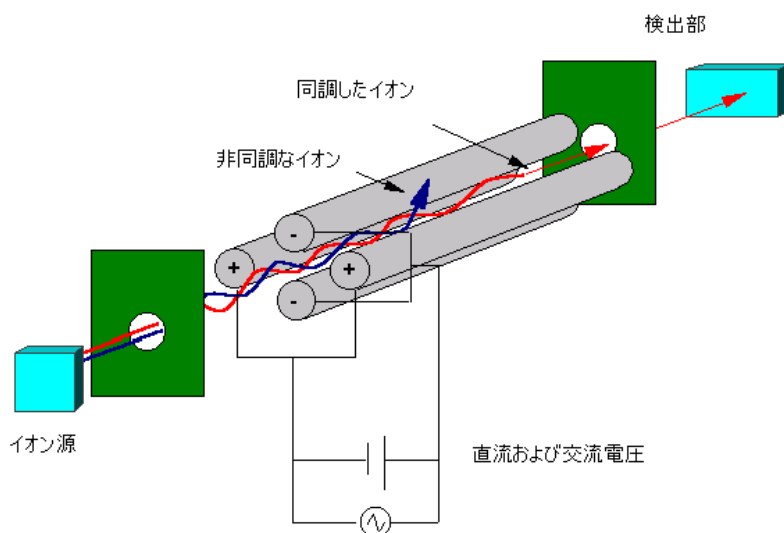


図 13 四重極型 Q・ポールマス

GC/MS で使うのは Q・ポールマスが多く本実験でもこの型の MS を用いる。

〔GC・MSの構成〕

質量分析計（MS）は、高感度かつ定性的な情報を有するため他の分析器と組み合わせて用いられることが多い。現在、汎用的にはICP・MSやLC・MSの普及が著しいが、GC・MSが最も普及している。GC・MSは混合成分をGCで分離し、この各成分をMSで各成分の開列（フラグメンテーション）による構造の情報を得る。2章で詳しく述べている通り、フラグメンテーションのおき方とフラグメントイオンの強度は化合物特有のものであるため、この情報により各成分を同定することが出来る。さらに、MSは微量検出に優れているため、環境試料中の極微量有害物質の分析など高感度分析機器としても利用されている。

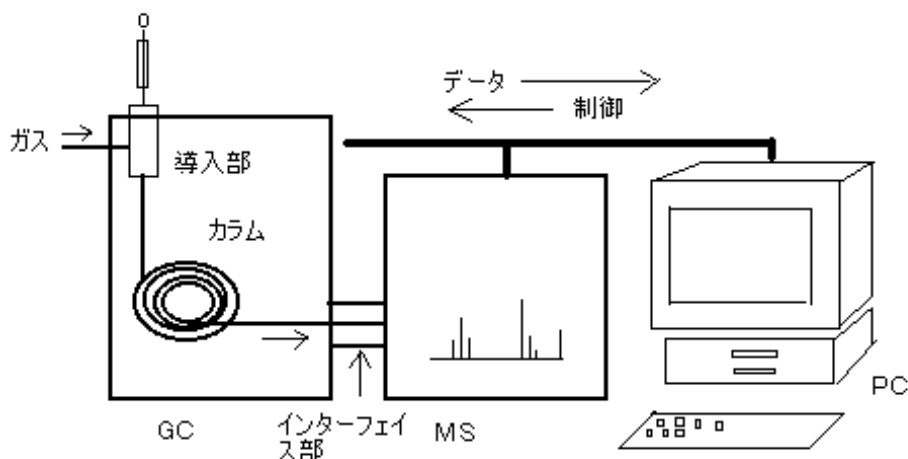


図 14 GC・MS構成図

GC・MSは図 14 のように構成されている。試料はシリンジ等で試料導入部に注入されると導入部の熱により気化される。移動相（主にヘリウム）と共にカラム内に運ばれ、固定相により各成分に分離される。分離された各成分は時間差をもって、MSに導入され、質量スペクトルを示すと共にその全イオン量の時間変化を示す全イオンクロマトグラムを得る。それを図 15 に示す。GCの情報やMSの測定結果はPCに送られ表示される。

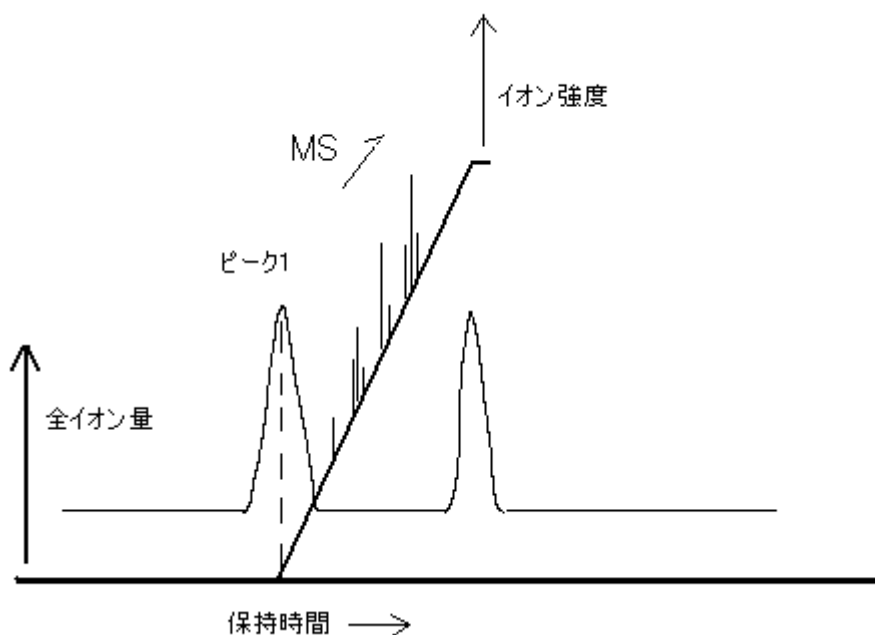


図 15 GC・MS測定結果の出力の概念図 縦軸が全イオン量、横軸が保持時間を示し、斜め軸がピーク1の質量スペクトル（m/z）である

3(B).2:実験

(1) 実験の目的

カラム内の分離を理解するために流速と理論段 (N) の関係を調べ、最適な実験条件を調べる。その条件下で、トルエンを含む5種類の有機溶剤を混合した未知試料を、極性の異なる2種類の固定液相を充填したカラムを装てんした熱伝導度検出器付きガスクロマトグラフ (TCG-GC) を用いて分離検出し、相対保持比表による定性分析および相対モル感度表による半定量を行う。また、内部標準法によりトルエンを定量する。次に、GC - MSを用いて同試料を分析し、質量スペクトルから定性を行う。あわせて分離の理論と検出原理について学ぶ。

(2) 実験条件および器具

注意: 本実験で使用する試薬は人体や環境に負荷を与えるものが多い。そのため、取り扱いには細心の注意を払って行うこと。

(2 - 1) 熱伝導度検出器付きガスクロマトグラフ (TCG-GC)

GCカラム充填剤

粒径80~100メッシュ

(a) ポリエチレングリコール1500 (PEG1500)

(b) シリコンオイルDC200

カラム長 2 m

カラム内径 3 mm

キャリアーガス ヘリウム (20 ml/min)

カラム温度 100

インジェクター温度 150

(2 - 2) GC - MS

カラム

溶融シリカキャピラリー / ポリジメチルシロキサン内壁コート (WCOT型)

カラム長 30 m

カラム内径 0.25 mm

キャリアーガス ヘリウム (1.6 ml/min)

カラム温度 100

インジェクター温度 150

(2 - 3) 器具

熱伝導度検出器付きガスクロマトグラフにて使用

1 ml, 2 ml ホールピペット各2本, 5 ml ホールピペット1本, 5 μ l マイクロシリンジ

安全ピペッター2個 サンプルピン 数個

GC - MSにて使用

5 μ l マイクロシリンジ

(3) 実験操作

(操作1:ヘリウム流速の調整)

- 1) TCD-GCのシリコンオイルDC-200のキャリアーガス流出部に流量計をセットする(流出部は高温であるので火傷に注意する事)。
- 2) 2 ml ホールピペットを2本用いて、トルエン、ベンゼンを1:1の割合で混合した試料を作製する。
- 3) GCのキャリアーガス流量調整バルブで流量を 20 ml/min に調整する。
- 4) これに2)で作製した試料を指定されたマイクロシリンジに 1 μ l 正確に採取した後、4 μ lの空気を入れ、GCに注入してクロマトグラムを記録する。
- 5) これを 16, 12, 8, 4 ml/min でも行う。
- 6) 得られたクロマトグラムの3つのピークのうち最後のピークの各理論段数を求める。
- 7) 次式から H を求め、流速との関係をグラフ化する。

$$H = 1/N$$

- 8) 最適な流速を決め、その値にキャリアーガス流量を設定する。
なお、ポリエチレングリコール1500の流速は担当者によって設定されているので調整する必要はない。

(操作2:定性分析)

極性の異なる2種類の固定液相を用いてトルエンを含む5種類の有機溶剤を混合した未知試料を測定し、保持比表(表4)と比較する。次にGC - MSで同試料を測定し、各成分の質量スペクトルを得て、保持比表と質量スペクトルから得た結果を基に総合的に同定する。

なお、これ以後の実験で試薬を扱う際は指定されたダクト排気口の下で行い、吸入しないように注意すること。

- 1) 未知試料 1 μ l を 5 μ l マイクロシリンジにて採取し、4 μ l 程度の空気を採取した後、GCに注入してクロマトグラムを記録する。
- 2) ベンゼン 1 μ l を同様にして 5 μ l マイクロシリンジにて採取し、4 μ l 程度の空気を採取した後、GCに注入してクロマトグラムを記録する。
- 3) 以上の操作1)2)を2種類の固定液相で行う。
- 4) 操作3)で得られたクロマトグラムを基にして各成分の保持比を求め、保持比表と比較して定性を行う。
- 5) 別室のGC - MSに未知試料 0.3 μ l を 5 μ l マイクロシリンジにて採取して注入してクロマトグラムを記録する。得られたクロマトグラムの各成分の質量スペクトルをプリントする。なお、GC - MSの測定については、「(付録)GC - MS測定マニュアル」を参照する。
- 6) 5)で得られた各成分の質量スペクトルを解析し、スペクトル集と比較検討する。
- 7) 4)と6)の結果から未知試料中の各成分を総合的に定性する。

(操作3:定量分析)

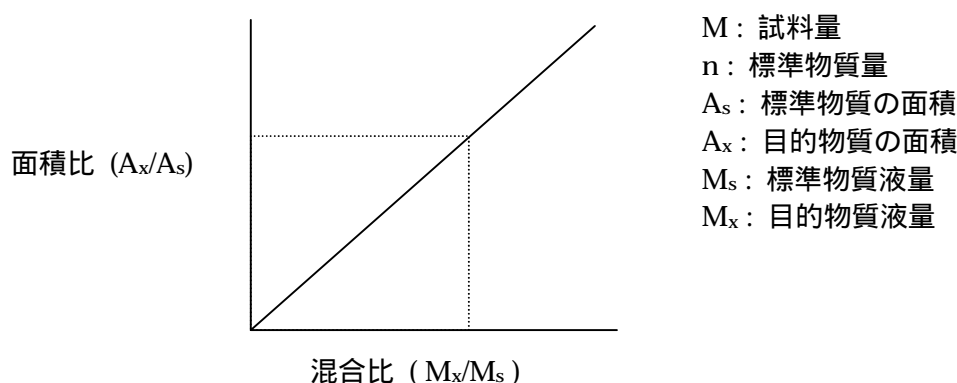
ベンゼンを内部標準物質として検量線を作成し、試料中のトルエンを定量する。

定量する際は分離の良いカラムを用いる。

- 8) 1ml, 2ml ホールピペットを用いてベンゼンとトルエンの混合試料を作成する。混合比は (1:2, 1:1, 2:1) とする。これらを操作2と同様にして分離の良い方のカラムを用いてクロマトグラムを得る。

- 9) 未知試料 5 ml とベンゼン 1 ml を正確に混合し、操作2と同様にして分離の良い方のカラムを用いてクロマトグラムを得る。
- 10) ピーク面積比(A_x/A_s)を算出し、操作 8)から作成した検量線によりその混合比を知る。この値とベンゼン添加量からトルエン含量を求める。そして、次式により試料中の目的成分の含有率 (v/v) を求める。

$$X (\%) = \frac{(M_x / M_s) \times n}{M} \times 100$$



- 11) 相対モル感度表(表5)から5種類すべての未知試料の定量を行う。

3(B).3:結果のまとめと設問

定性分析および定量分析の結果および導出した根拠を明確にしてレポートを作成しなさい。また、下の設問を中心に考察せよ。

(設問)

- A) GC - MS のように2つの分析法をつなぐ時の注意点について考察せよ
- B) ポリジメチルシロキサンの構造式を描き、固定相としての性質の違いを述べよ。
- C) カラム液相の極性と分離の関係について、自分の分析した試料成分を例にして述べよ。
- D) 保持比 k と分配平衡定数 $K = (\text{固定相内の試料濃度}) / (\text{移動相内の試料濃度})$ はどのような関係にあるか考察せよ。
- E) k が1のとき、保持時間は空気の何倍になるか。 k が10のときはどうか。
- F) van Deemter の式における A, B, C の各定数はクロマトグラフィー分離過程におけるどのような現象と関連していると考えられるか。
- G) ある未知試料をガスクロマトグラフィーにかけたところ、いくつかのピークが空気のピークのすぐ後に重なって現れ、十分な分離がなされなかった。よりよい分離を得るにはどのような方策が考えられるか。
- H) 相対モル感度法と内標準法ではどちらがより正確な値を求めることが可能か。
- I) この実験で使用したカラムの最適条件下における理論段数を計算せよ。

(参考書)

クロマトグラフィー 津田孝雄著, 丸善

ガスクロマトグラフ法 小島次雄, 大井尚文, 森下富士夫著

ガスクロマトグラフィーの実際 松隈 昭著

分析化学 Pecsok 他著, 荒木峻 他訳 p101

分析化学 鎌田仁著 p346

実験化学講座 続9(丸善)ガスクロマトグラフィー

機器分析入門 日本分析化学会九州支部編 南行堂 1989

キャピラリーガスクロマトグラフィー 日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会 朝倉書店

Spectrometric identification of organic compounds, R.M. Silverstein and F.X. Webster,
6th edition, John Wiley & Sons Inc., 1998.

有機化合物のスペクトルによる同定法、R.M. Silverstein ら著、荒木ら訳、東京化学同人、1963.

有機化合物のマススペクトル、H. Budzikiewicz ら著、中川ら訳、丸善、1973.

有機化合物の質量スペクトルの解析、C. Djerassi 著、中川ら訳、南江堂、1965.

機器分析のてびき 第1集、(2版)、泉ら監修、化学同人、2000.

表4 カラム温度100 における相対保持比

化合物名	沸点 ()	分子量	比重 D20	シリコンオイル DC-200	ポリエチレング リコール-1500
n-ペンタン	36	72.15	0.6264	0.51	0.53
n-ヘキサン	69	86.17	0.6548	0.71	0.10
シクロヘキサン	81	84.18	0.7791	1.12	0.24
n-ヘプタン	98	100.20	0.6795	1.34	0.18
メチルシクロヘキサン	101	112.17	0.9156	1.69	0.34
n-オクタン	126	114.23	0.7025	0.42	0.36
イソオクタン	99	114.22	0.6919	1.29	0.16
酢酸メチル	58	74.08	0.9330	0.35	0.32
酢酸n-ブチル	126	116.16	0.8825	2.47	2.15
酢酸n-ブチル	102	102.1	0.8870	1.27	1.23
酢酸エチル	77	88.1	0.9003	0.56	0.74
メタクリル酸メチル	100	100.11	0.9430	1.27	1.44
メタノール	65	32.04	0.7910	0.10	0.76
エタノール	78	46.07	0.7866	0.19	0.89
2-プロパノール	82	60.09	0.7863	0.28	0.89
2-ブタノール	100	74.12	0.8069	0.45	1.72
1-ブタノール	118	74.12	0.8095	0.92	3.29
1-プロパノール	61	60.09	0.7993	0.44	1.77
アセトン	56	58.08	0.7880	0.27	0.53
2-ブタノン	80	72.10	0.8047	0.43	0.89
2-ペンタノン	103	86.13	0.8089	1.08	1.40
ベンゼン	80	78.11	0.8787	1.00	1.00
トルエン	111	92.13	0.8660	2.05	1.78
エチルベンゼン	136	106.17	0.8672	3.78	2.92

(固定相液体量: 15 ~ 20wt%, カラム内径: 3mm, カラム長さ: 2m
 キャリヤーガス: ヘリウム 約20ml/min 基準物質: ベンゼン)

表5 Heをキャリア ガスとした場合の相対モル感度(ベンゼン = 100)

ヘキサン	123	シクロヘキサン	114
ヘプタン	143	メチルシクロヘキサン	120
オクタン	160	エチルシクロヘキサン	145
ノナン	177	2-メチルヘキサン	136
デカン	199		
アルゴン	44	ベンゼン	100
窒素	42	トルエン	116
酸素	40	エチルベンゼン	129
炭酸ガス	48	キシレン	130
一酸化炭素	42	プロピオンアルデヒド	74
アセトン	86	ブチルアルデヒド	88
2-ブタノン	98	ジエチルエーテル	110
ジエチルケトン	110	ジイソプロピルエーテル	130
2-ペンタノン	102	ジ _n -プロピルエーテル	131
メタノール	55	酢酸エチル	111
エタノール	72	酢酸イソプロピル	121
1-プロパノール	83	酢酸 _n -ブチル	135
2-プロパノール	85	酢酸 _n -アミル	146
1-ブタノール	95	酢酸イソアミル	145
2-ブタノール	97	酢酸 _n -ヘプチル	170
		メタクリル酸メチル(MMA)	119

(付録) GC - MS測定マニュアル

1. 測定法

はじめに、オートマスを立ち上げる。パスワードは「jeol」。次に、図 A のオートマスの“測定”をダブルクリックする。



図 A オートマス

以下の図 B の画面があらわれる。

左上の「Load ACQ」をクリックし、図 C の ACQ (1 shot) を選択する。

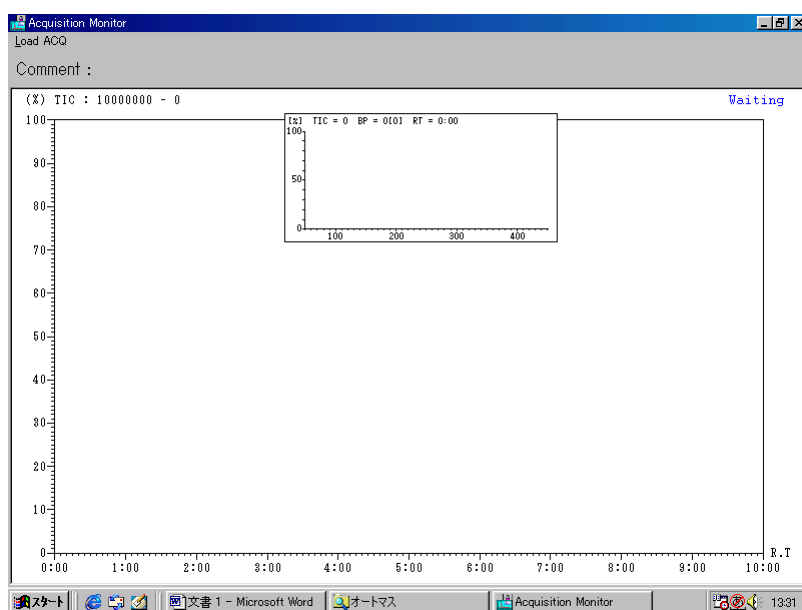


図 B 測定画面

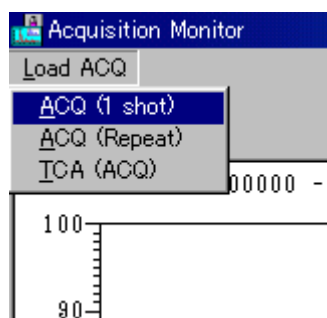


図 C 測定法の選択

同時並行してシリンジを未知試料で5回以上共洗いし、1 μ l 採取する。この時は、空気は入れなくてもよい(少し入っていてもかまわない)。マイクロシリンジは壊れやすいため、きわめて慎重に扱うこと。

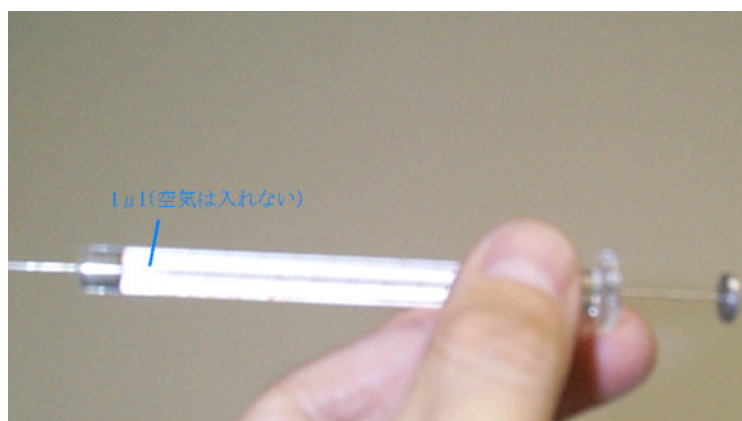


図 D マイクロシリンジ

ACQ (1 shot) を選択すると、図 E の画面が現れる。ここで、測定データファイルを作成する。

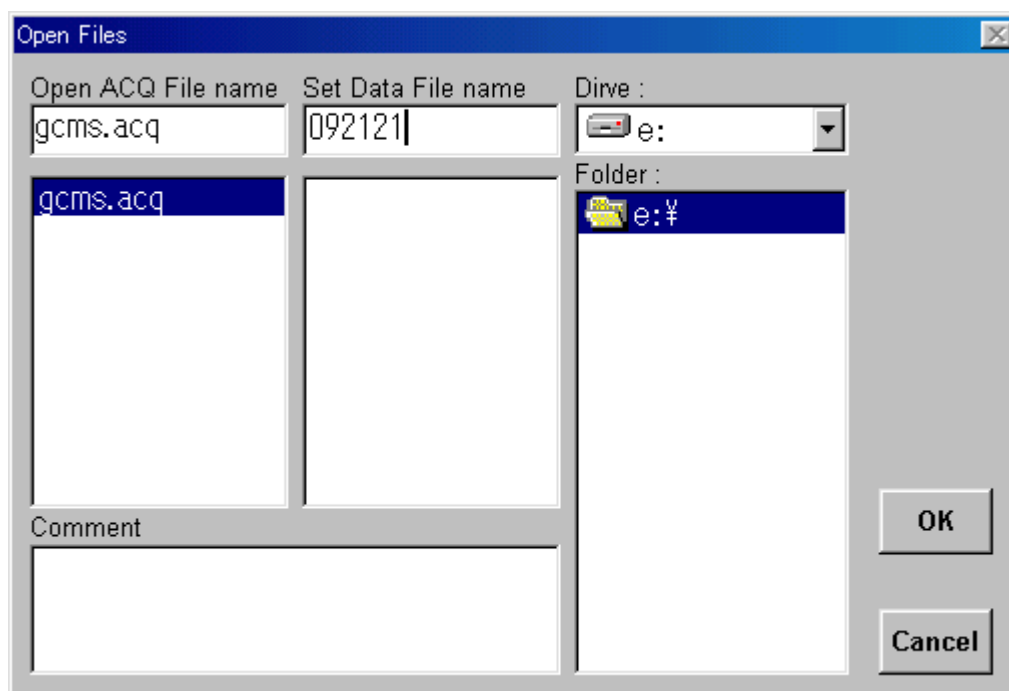


図 E 測定データファイル作成画面

- “Dirve” 「e」を選択する。
- “Open ACQ File name” を「g c m s . acq」を選択する。
- “Set Data File name” に、測定者がわかるファイルネーム（氏名や学籍番号等）を入れる。
以上ができたなら “OK” を押す。

すると、以下の図 F の測定コマンド画面があらわれる。

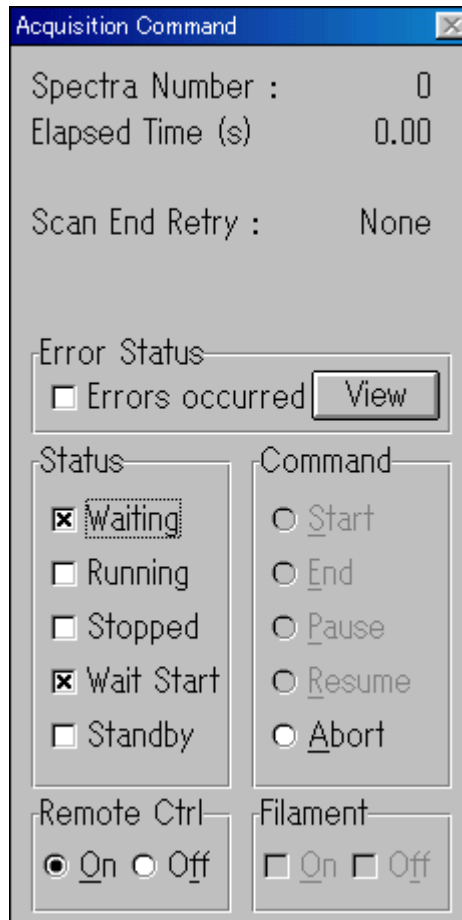


図 F 測定コマンド画面

次に、下図（図 G）GC の操作パネルの青い「START」ボタンを押す。



図 G GC 操作パネル

次を確認する。

- ・ 図 G の GC 操作パネルの GC 表示部の画面の TIME の数値が上がっている。

COL	TEMP	TIME
INIT	100	0.18

- ・ 図 F 測定コマンド画面の Elapsed Time(s)の数値が上がっている。

Elapsed Time(s)が 1 : 00 を過ぎると測定コマンド画面が消え、図 B の測定画面が再び現れる。

図 B の測定画面右上の “ Waiting ” が “ Running ” になっていることを確認する。

図 H のようにマイクロシリンジを GC 導入口に根元まで射して試料をすばやく注入する。

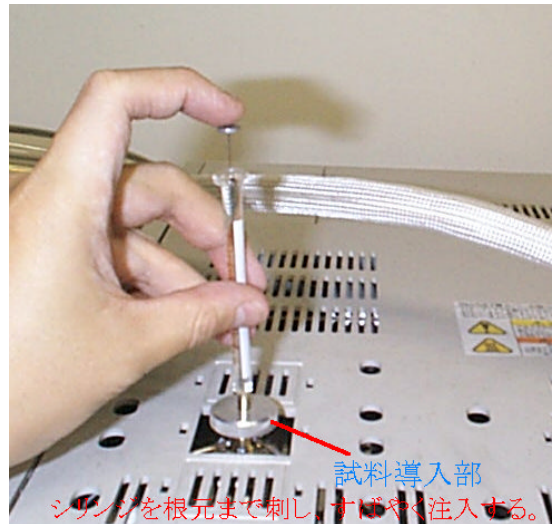


図 H 試料の注入法

試料を注入したら、図 I のような測定結果が得られるのを待つ。測定は 6 分で終了する。

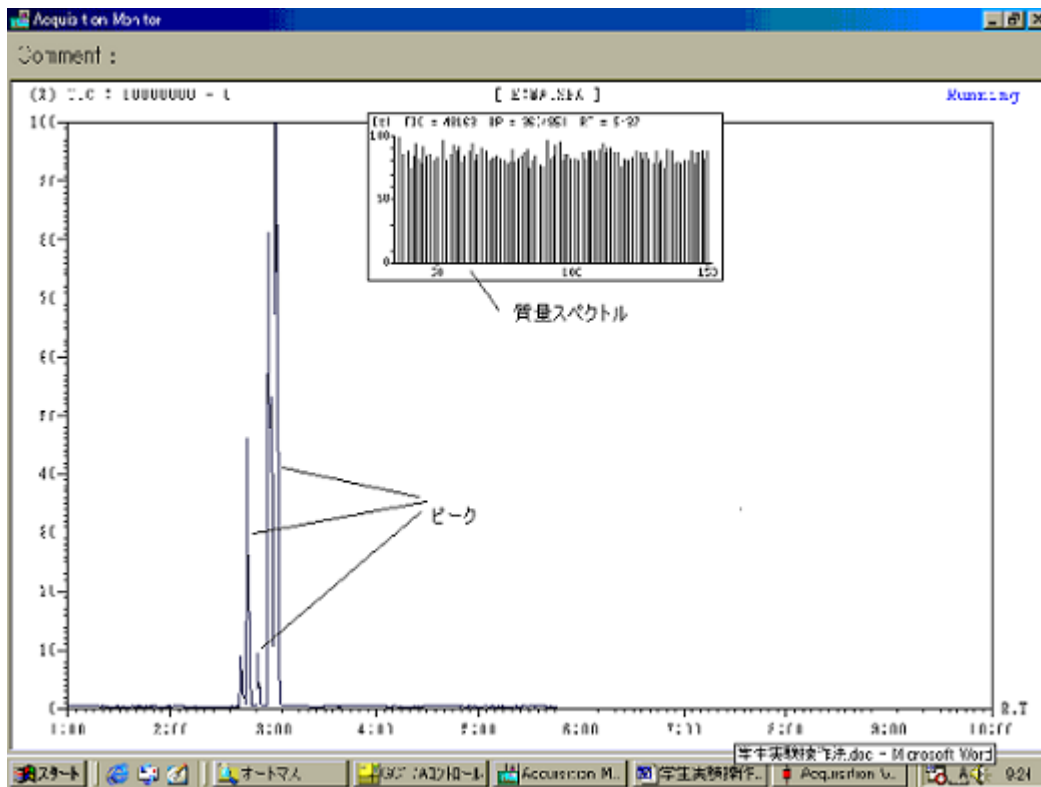


図 I 測定画面（縦軸：強度（任意単位）横軸：時間、画面中央上：質量スペクトル）
測定が終了したら図 I の測定画面右上の “Running” が “Waiting” になる。
上記を確認後、GC のコントローラ部の “STOP” を押す。

次の測定者が居れば、同様の操作を繰り返す。

2 . GCチャートと質量スペクトルの印刷

図 A のオートマスを呼び出し、“定性解析” をダブルクリックします。

図 J のような LucyDis Application 画面があらわれます。

この画面の左上 File Open を行う。

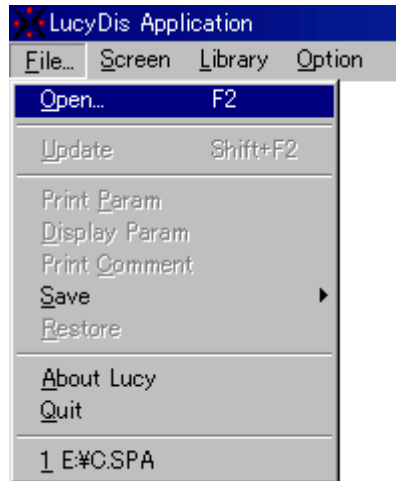


図 J 定性画面の測定データの読み込み

すると、以下の画面が現れる。

ドライブ (V) を “e” に選択し、自分たちの指定したファイル名 (N) を選択する。

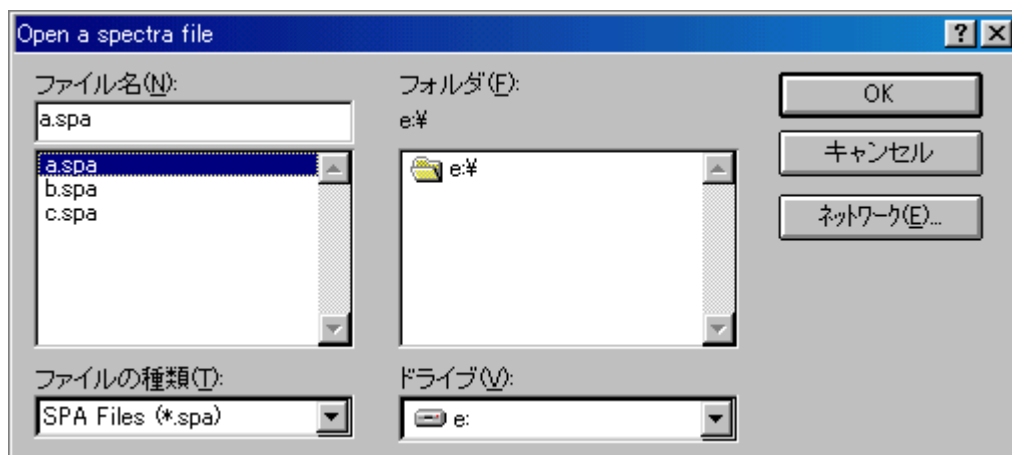


図 K 定性分析用ファイル選択画面

すると、下図の画面が現れる。

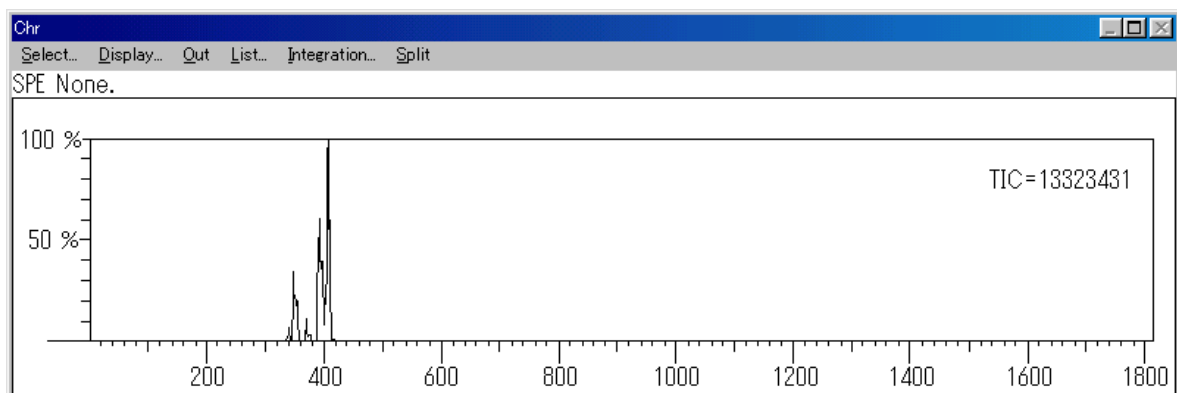


図 L 測定結果画面

Display の Time Scale をクリックする。
Display の Label をクリックする。

図 L の横軸表示が時間表示になる。
図 L のピークに時間が表示される。

上記を行った後、Out の Print で GC チャートを印刷する。

Integration の Auto Int. をクリックする。

図 M のようにピークが着色される。

Integration の Report をクリックする。

図 M のようにピーク面積、ピーク強度が表示される。

上記を行った後、Out の Print で積分結果を印刷する。

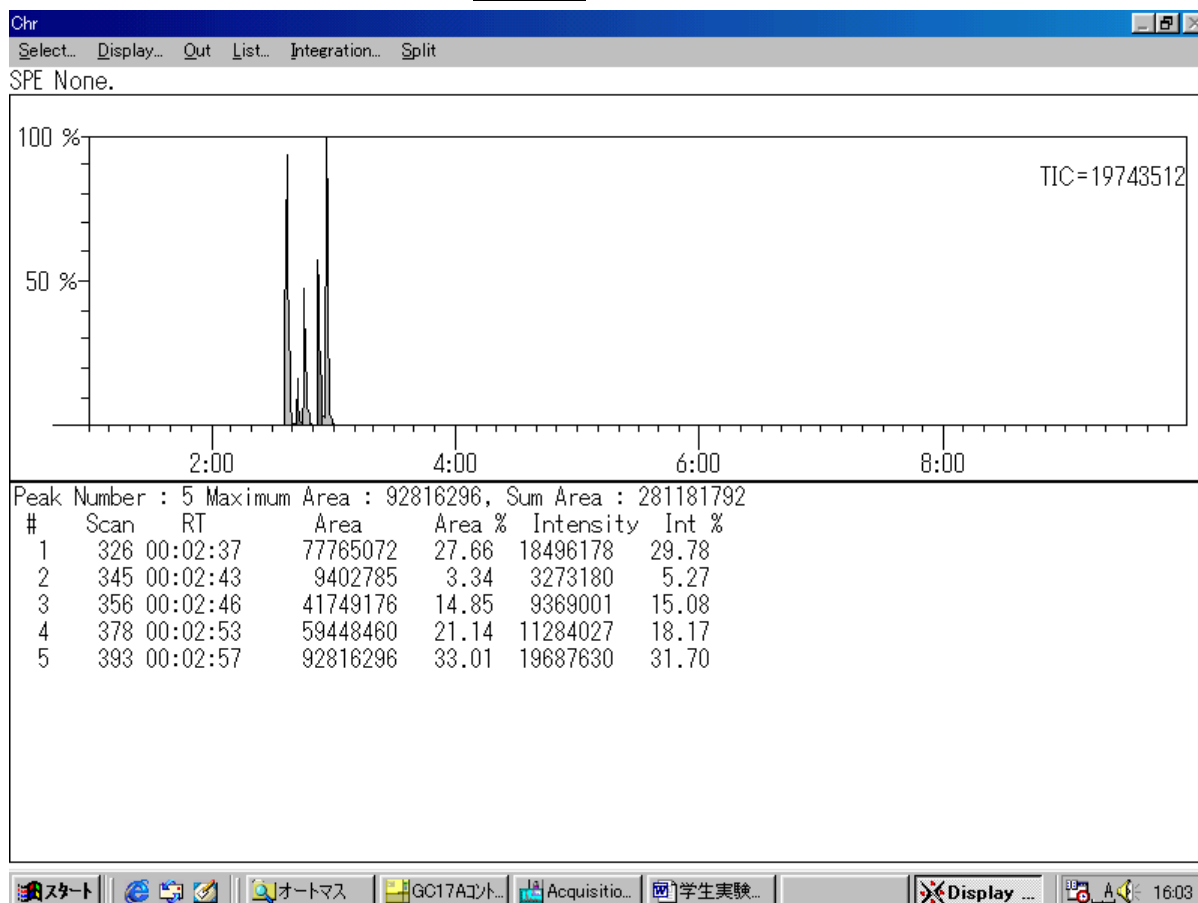


図 M Integration Report 画面

下図 (図 N) のように Select Auto Spe を選択する。

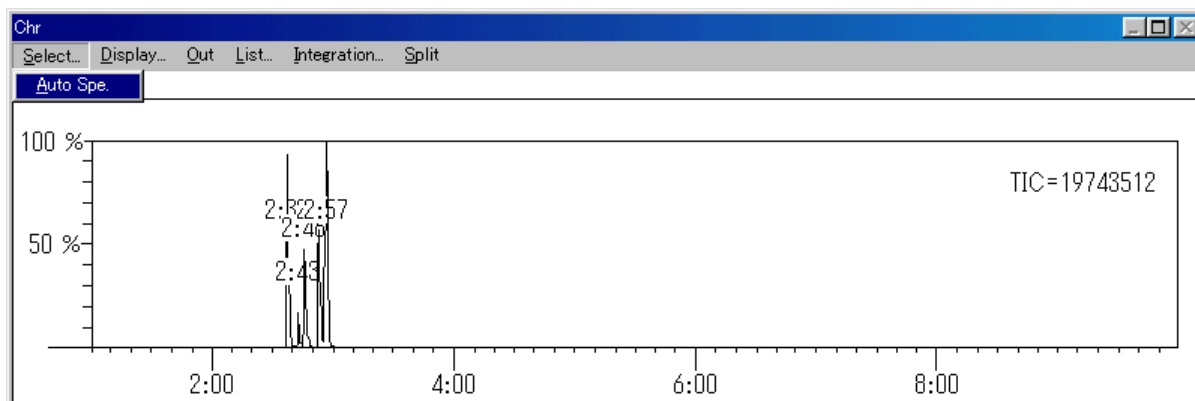


図 N GC チャート

すると、以下の画面があらわれる。

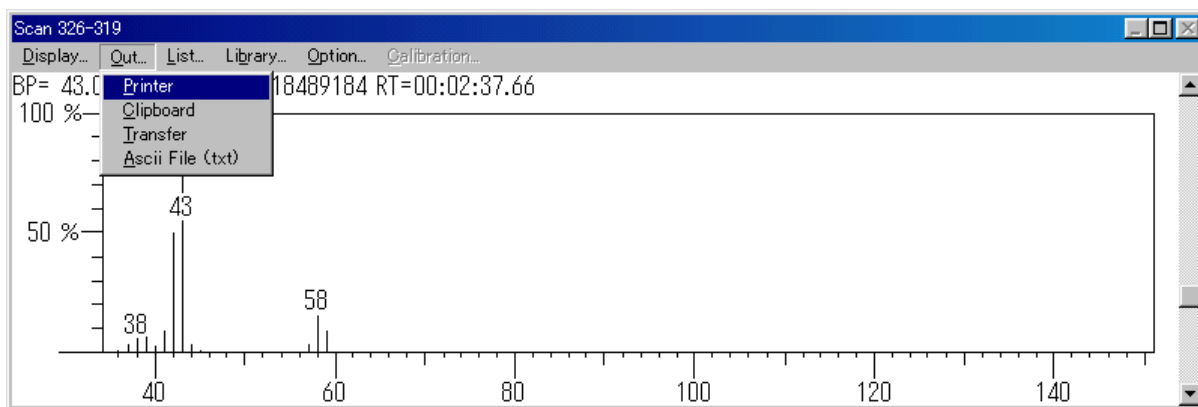


図 O 質量スペクトル画面

この画面の上中央の RT=00:02: * * は図 N の GC チャートにある各ピークの RT に相当する。

Out Printer を選択する。これを繰り返し（各ピークをダブルクリック）5つのピークの質量スペクトルを印刷する。

印刷されたものは合計で 7 枚である。

- ・ GC チャート
- ・ 積分結果
- ・ 5つのピークの質量スペクトル

これらを用いて、備え付けの質量スペクトル集を用いて各ピークを検索する。