

実験 C 固相抽出による色素の濃縮

(Solid Phase Extraction, SPE)

1. はじめに

微量なものは選択濃縮して測る

健康関連の有害物質の測定では、 $\mu\text{g/l}$ 、あるいは、 ng/l といった微量レベルまで測定を行う必要がある。無機系の元素分析には ICP 発光分析装置 (ICP/AES) もしくは ICP 質量分析装置 (ICP/MS) を用い、有機系の個々の有害物質の分析にはガスクロマトグラフ質量分析器 (GC/MS) や高速液体クロマトグラフ質量分析器 (LC/MS あるいは LC/MS/MS) という機器を用いることが多い。これらの機器は高感度で、分析対象物質を分析対象物質以外の物質から分離して測定するのに優れた性質を持つ機器ではあるが、これらの機器に試料を導入する前に対象物質のみをなるべく他の夾雑物質から分離して濃縮することができれば、より高感度で選択的な分析ができる。

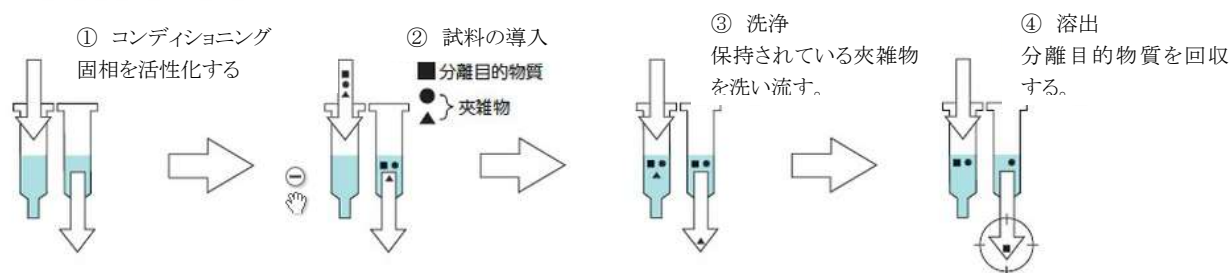
固相に測定対象物質を保持させる

雑多なものが混合した試料から、目的のものだけを回収する方法に固相抽出法 (Solid phase extraction) というものがある。固相抽出法では、測定目的のものを保持し、分析の妨害となるものを通過させる性質を持った固相に試料を通水し、移動相に溶解している微量の測定対象物質を固相に吸着させる。いくつかの固相が分析現場で実用化されているが、個々の有機物質の分析で、最も汎用されているのが、ODS (Octa Decyl Silyl, C_{18} とよく書く) という固相を用いて、疎水性の化合物を固相へ吸着させ、有機溶媒で脱離させ分離濃縮する方法である。

ODS は高速液体クロマトグラフィーの固定相としてもよく用いられる

ODS には移動相が有機溶媒になると保持していた対象物を移動相に再び溶解させる性質があるため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の固定相としてもよく用いられる。移動相中の有機溶媒と水との混合比によって、固定相への物質の保持の強さが変わるため、化合物の親水-疎水の性質の差で混合物から様々な物質を分離できる。今回の実験では、水試料に含まれる微量の色素、具体的には、

● 固相抽出製品の基本的な原理



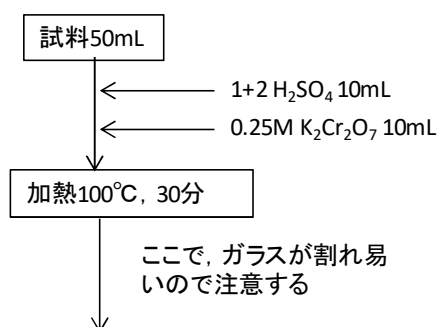
(出典：GL サイエンス固相抽出カタログ)

化粧品用色素としても用いられる赤色 202 号, および, 食品色素としてナス果皮色素, を親水-疎水の性質をもとに濃縮する。濃縮した試料は, LC/MS/MS などの機器分析にかけたいところだが, 今回の実験では, 吸光度測定によって, その濃縮操作が定量的に行われるのかどうかを検証する。

【予習課題 1】テキストのここまでの記述で「抽出」とはどのような意味で用いられていますか。

【予習課題 2】今回の実験において, 前のページの図で分離目的物質は何と何か。溶出時に目的物質の回収に用いる溶媒は何か, 実験方法を読んだうえで答えよ。

【予習課題 3】このあとの実験方法を参考にして, 実験操作手順を右のようなフロー図でまとめなさい。



【予習課題 4】表 1, 表 2 をあらかじめ実験ノートに書き写しておくこと。 予習課題のフロー図の作成例

2. 実験材料

アルカリ性メタノール メタノール 500 ml に水酸化ナトリウム 1 粒を加えよくとかしたものを各班に 100 ml をガラス容器にて配布する。劇物であるので, 取扱注意。

【業務用メモ】100 ml×24 本/回×2 回/週 = 5 l/週

1 mg/l 赤色 202 号溶液 赤色 202 号 0.001 g に水を約 20 ml 加え, 硫酸 1+2 を 1 ml 加え 1 l にメスアップした溶液を各班に 30 ml ずつ配布する。

10%硫酸溶液 水を 370 g に硫酸(1+2)を 100 g ゆっくり加えて(沸騰しないよう, 必要に応じて冷却しながら)調整する。各班に 20 ml ずつ配布する。劇物であるので, 取扱注意。

酢酸・メタノール混合溶液(50:50(v/v)) 酢酸 500 ml とメタノール 500 ml を発熱に注意しながら(必要に応じて冷却しながら)混ぜた溶液を 2 班に 35 ml ずつ配布する。劇物であるので, 取扱注意。

【業務用メモ】35 ml×12 本/回×2 回/週 = 1 l/週

器具

5 ml のプラスチックシリンジ 1 個(メタノール用[テルモシリンジ型シーリングに限る])

5 ml のプラスチックシリンジ 1 個(純水用[安物で可])

10 ml のプラスチックシリンジ 1 個(試料溶液ロード用[安物で可])

ODS(C₁₈) 固相 GL サイエンス社の Slim J C18 を用いる。1 班につき 1 個用いる。

分光光度計セル 1 班につき 2 個用いる。

分光光度計

ガラス棒

使い捨て手袋
ガラスビーカー

3. 実験方法

3. 1 化粧品色素の固相抽出実験

- 1) 3 個のプラスチックシリンジを試料溶液用、メタノール用、純水用と区別して使えるように目印を付ける(丸シール推奨, マジック不可。再使用するため)。
- 2) **コンディショニング 1** アルカリ性メタノール 2 ml を気相のないようにシリンジで吸引し(気相がある場合には, シリンジを逆さにして追い出す), シリンジを ODS 固相へ接続する。次に ODS の反対側の口から液が出る寸前まで(だいたい 0.3 ml)シリンジを押し込み, シリンジは固相から抜き取らず 1 分待ち, 固相にメタノールをなじませる。その後, 残りの液を押し込み流出液を廃液とする。再度, アルカリ性メタノール 2 ml を ODS 固相へ押し込み流出液を直接, 分光光度計のセルに注ぐ。シリンジは, 固相の乾燥を防ぐため, 固相から抜き取らない。
- 3) **ブランク測定** アルカリ性メタノール溶液を対照(吸光度 0.000)として, 520nm の吸光度を分光光度計で測定する。→ 「4. 1 分光光度計の操作を参照」→ 廃液はメタノール廃液として回収する。
- 4) **コンディショニング 2** 純水用のシリンジで純水 5 ml を固相に押し込む(純水は, シリンジ先端まで水で満たしておき, メタノールと純水の間で気泡を押し込まないように注意する。この際, 固相からは, メタノールを含む水が排水されるが, 本実験に限り, 流しに捨ててよい。
- 5) **試料ロード** 1 mg/l 赤色 202 号溶液 3 ml を試料溶液用シリンジで吸引し, コンディショニングした固相に 20 秒程度かけてゆっくり試料を押し込む。固相に空気を押し込んでしまうと, 試料が固相に均一に分配されなくなるので, 先端まで色素溶液で満たしたシリンジを固相には接続する。この 5)~7), 固相から排水される水は, 本実験に限り, 流しに捨ててよい。
- 6) **洗浄** 試料溶液用シリンジを抜き取り, すぐに, 純水用シリンジで純水 3 ml をゆっくり押し込む。
- 7) **乾燥** 純水用シリンジで空気を吸い込み固相に押し込み, 固相内の水を完全に追い出す(2-3 回, 水が出なくなるまで空気を押し込む)。
- 8) **溶出** アルカリ性メタノール 2 ml をシリンジで吸引し, シリンジを ODS 固相へ接続する。次に ODS の反対側の口から液が出る寸前まで(だいたい 0.3 ml, 最初の濃厚な 1 滴を漏らさないため, 絶対に「寸前」を守ること)シリンジを押し込み, シリンジは固相から抜き取らず 1 分待ち, 固相にメタノールをなじませる。その後, 残りの液を押し込み流出液を直接, 分光光度計のセルに注ぐ。さらにそのメタノール用シリンジで空気を 2-3 度押し込み, 固相内のメタノールを完全にセルに追い出す。分光光度計セルを持つ手には, 使い捨て手袋を着用し, 直接メタノールが肌に触れないようにする。
- 9) **試料測定** セルに 10%硫酸を 30 μ l 加え, セル内の溶液を 1 ml のマイクロピペットで数回, 吸引

と排出とを繰り返すことにより攪拌する。次に分光光度計で 520nm の吸光度を 3) と同様に測定する。測定の終わったセルはよく洗浄する。廃液はメタノール廃液として回収する。

- 10) 再度、2)～9)の操作を繰り返し、結果を下表の 2 回目の欄に書き込む。1 回目と 2 回目の吸光度の差が 10%以上ある場合(表 1 で a_2/a_1 が 0.9～1.1 の範囲に入らない場合)には、さらに 3 回目の試験(再試験)をおこなう。
- 11) 次に、さらに高倍率の濃縮実験を行う。まず、2), 3), 4)の操作を再度行う。次に、1 mg/l 赤色 202 号溶液 15 ml を固相に押し込む。何回かシリンジの抜き差しを繰り返すことになるが、純水と試料の間、試料と試料の間に空気が入らない(カラムを乾燥させず、かつ、気泡を押し込まない)ようにするため、シリンジ先端部は常に試料で満たしておくこと(空気が入れば逆さにして抜く)。固相に空気を押し込んでしまうと、試料が固相に均一に分配されなくなる。続いて、操作 6)～9)を繰り返し、表の高倍率の欄に結果を記入する。ただし、9)で測定したセル内の溶液は、捨てずに、「4. 2 吸光スペクトル測定」にしたがい、スペクトル測定を行う。
- 12) 使い終わった固相への色素の付着などを観察しておく。気の付いたことはノートに記しておく。

表 1 赤色 202 号溶液の固相抽出実験

試料の量	1 回目 (3 ml)	2 回目 (3 ml)	再試験 (3 ml)	高倍率 (15 ml)
ブランク測定の吸光度				
試料測定の吸光度	a_1	a_2	a_3	a_4
		a_2/a_1		a_4/a

注) a とは a_1 , a_2 , a_3 のうち、実験が正確に行われたと考えられる値の平均値

3. 2 ナス果皮色素の抽出

- 1) なすびの皮を皮むき器でむき、なすび 1/4 本分の皮を約 1 cm 四方の大きさに切り刻み、紫色の部分のみ 100 ml ガラスビーカーに移す(プラスチックビーカーは酢酸・メタノール混合溶液に徐々に溶解するため用いてはならない)。なすびの白い部分は食べずに捨てる。
- 2) 酢酸・メタノール混合溶液(50:50(v/v))10 ml をメスシリンダー(揮発性の酸をはかり取るとマイクロピペットが痛むのでマイクロピペットは用いないこと)でビーカーに加え、ガラス棒で混ぜ、溶液が濃い紫色になるまで 5 分間混ぜる。この溶液を濃厚ナス果皮色素溶液と呼ぶ。メスシリンダーはすぐに洗う(プラスチックは徐々に酢酸・メタノール混合溶液に溶解するため)。
- 3) ナス果皮をピンセットで取出し、可燃ごみへ捨てる。ピンセットをすぐに洗う。
- 4) サランラップでカバーして、少しでも酢酸の揮発を抑える。
- 5) ナス果皮色素溶液と赤色 202 号溶液の色の見た目の違いを実験ノートに記しておく(レポートで、スペクトルの差と色の見た目の対応を考察する課題がある)。

3. 3 ナス果皮色素の固相抽出実験

- 1) 水を 100 ml ビーカーに約 50 ml 入れ、そこへナス果皮色素溶液 2 ml を加えたあと、ビーカーの目盛で 100 ml にまで水を加え、スターラーで攪拌する。この溶液を希薄ナス果皮色素溶液と呼ぶ。最初に水を入れておく理由は、プラスチックのビーカーが酢酸・メタノール混合溶液に少しずつ溶解するため、プラスチックビーカーを保護するためである。
- 2) 実験 3. 1 と同様の操作を、1 mg/l 赤色 202 号溶液の代わりに希薄ナス果皮溶液を用いて固相抽出実験をおこなう。スペクトルの測定も同様に行う。
- 3) 使い終わった固相への色素の付着を観察しておく。気の付いたことはノートに記しておく。

表 2 ナス果皮溶液の固相抽出実験

試料の量	1 回目 (3 ml)	2 回目 (3 ml)	再試験 (3 ml)	高倍率 (15 ml)
ブランク測定の吸光度				
試料測定の吸光度	a_1	a_2	a_3	a_4
		a_2/a_1		a_4/a

注) a とは a_1 , a_2 , a_3 のうち、実験が正確に行われたと考えられる値の平均値

4. 分光光度計の操作

4. 1 吸光度測定

0) 分光光度計の電源を投入し、装置が自己診断などを行うのを待つ。

**) 4.2 のスペクトル測定のモードから戻す時は、赤いボタンを押し「Are you sure」と訊かれたら Yes と答える。

1) Basic Modes, Absorbance と操作し、Wave length = 520 nm に波長を合わせる。

2) 装置が安定するのを待つ(15 分以上)。

3) メタノールをセルに 7 割程度の分量入れ(使い捨て手袋着用)、側面に水滴があればふき取り、気泡があれば振動を与えて気泡を除去し、光度計にセットする。吸光度計のどこを光が通っているのか、セルの透明の面をどちらへ向けてセットするのか、などの基本事項を十分留意すること。セルを扱うとき、光が通過する面にはさわらないこと。操作がわからない場合には、TA などに訊く。

4) reference 測定モードにして、ゼロ調整ボタン(緑のキー)を押し、アルカリ性メタノール測定時の吸光度を 0.000 にする。

5) 試料をセットし、ふたを閉めて吸光度を測定する。

4. 2 吸光スペクトル測定

- ①初期画面に戻し、プリンターのスイッチを入れる。(プリンターを使わない場合もある。)
- ②Basic Modesではなく、「2. Applications」を選択。
- ③「1. Wavescan」を選択。
- ④「Start wavescan」400 と入力し「OK」。
- ⑤「End wavescan」650 と入力し「OK」。
- ⑥「Scan option」 「2. Medium」 「OK」。
- ⑦「Peak table」 「2. On」 「OK」。
- ⑧水色のセルホルダーに対照のメタノールが入ったセルを、2 番目のセルホルダーに試料水のセルを入れる。このとき、測定光（左右に通る）がセルの透明な面を通過できるよう、方向を考えてセルを入れる。
- ⑨「Reference/Press Run Key」 の表示に従い、緑のキー（◇）（Run Key のこと）を押してレファレンス測定。
- ⑩レファレンス測定後、セルホルダーが自動的に回転し 2 本目のセルが測定位置(一番、奥のポジション)に来ていることを確認する。セル位置を入れまちがえる人がときどきいるので注意。緑のキー（◇）を押して試料水の測定。
- ⑪この段階で自動的にスペクトルがプリントアウトされていない場合は、キー（・）を押してプリントアウト。プリンターが壊れているか、プリンターを使わないよう指示があった場合には、スペクトルを書き写す。
- ⑫「Data」 矢印を使って、吸光度の極大値を与える波長とそれぞれの吸光度を書き取る。同じ極大値の波長が続く場合は、その範囲を ○○○～○○○ nm のように書き取る。

注意：

- a) ⑫の操作を行うとき、機種によっては旗の印が出るものがあるが、無視すること。自分の目で 2 つの極大値を確認し、そのときの波長をノートに記入する。
- b) 操作を間違えたときは初期画面まで戻り最初からやり直すこと。もとに戻るときは、赤いキーを 1、2 回押す。すると「Are you sure?」と聞いてくるので、「Yes」を選択する。

5. あと片付け

- ・メタノールや色素の混じった溶液は有機溶媒の廃液タンクに回収する。ただし、今回の溶液は、毒性や排水施設に与える影響が小さいので、原液は回収するが、洗浄廃水は一切回収しない。洗浄廃水は流しに捨てる。
- ・10%硫酸は、容器に入れたまま机の上に置いておく。
- ・月曜日の実験者は、シリンジや吸光度測定用セルを翌日火曜日にも使用するため、よく洗って机の上に置いておく。火曜日の場合には、指示に従う。

6. レポート課題

【結果 1】表 1、表 2 の形式で結果をまとめる。

【結果 2】赤色 202 号とナス果皮溶液とのスペクトル測定結果を図示せよ。写真や画像をレポートとするのではなく、グラフ用紙にトレースし直すことを推奨する。スペクトルデータが得られていない場合、極大吸光波長、極大吸光波長範囲を両溶液で比較せよ。

【考察 1】同一試料を複数回測定した場合の再現性について、「概ね〇%の誤差があった」といういい方でまとめよ。~~実験 A のマイクロピペットの繰り返し誤差と比較して、どちらが大きいのか。その理由は何か。~~

【考察 2】濃縮倍率を高めた場合に、「定量的に」固相に目的物質を吸着することができたか。「定性的」とは傾向が正しいこと、「定量的」とは量的比例関係が成立していることをいう。つまり、表 1、表 2 で a_4/a が 5 付近の値であるかどうかを検討する。また、ちょうど 5 にならない理由を考察する。データ処理する場合に、ブランクを差し引いて考えるべきかどうかは、指定しないが、どうして、ブランクを差し引いたのか/引かなかったのか、理由をレポートに書くこと。

【考察 3】光の波長とその色は、右表のようになっている。たとえば、630 nm に吸光がある物質(アンモニアの測定に使用するインドフェノール青色吸光物質)は、赤の光を吸収するので、結果として残った光である青色に見える。今回の吸光スペクトルでは、何色の光が吸収されるので、結果として、何色が残っているのか。また、赤色 202 号とナス果皮とで見た目の色の違いがスペクトルの差に反映されていたか、実験結果をもとに考察しなさい。

色	波長 (nm)
紫	380～450
青	450～490
緑	490～570
黄	570～590
橙	590～620
赤	620～750

【考察 4】その他、考察、実験の感想などを自由に記せ。(5 行以上～2 ページ以内、全員が書くこと)たとえば、化粧品志望の人なら「実験 J の生分解性試験の結果もあわせて考えて、赤色 202 号についての考察」、就職に関心のある人なら「食品や環境試料の委託分析を受ける民間会社にはどのような会社があるか」などについて考えたり調べたりする。

オゾンと有機物質の反応

一昨年までの本実験では、オゾンによる色素の脱色を扱っていた。

飲料水は、無色・無臭・無味のものが望まれる。また、ホテルの部屋などで前の人のにおいが残っていると、たとえ、健康影響がないとしても、ホテルの評判が悪くなる。

水道水中の微量物質の分解やホテルの部屋の脱臭などに広く用いられている方法として、オゾンによる酸化分解処理がある。