液滴型向流クロマトグラフィー (DCC) の溶出プロフィール と食品汚染物質の分画方法についての検討^{*1}

(昭和 60 年 7 月 1 日受理)

陰 地 義 樹^{*2} 宇 野 正 清^{*2} 永 美 大 志^{*2}
植 田 直 隆^{*2} 上 田 保 之^{*2}

Studies on Droplet Counter-current Chromatographic Fractionation for Food Contamination Monitoring by GC/MS

Yoshiki ONJI, Masakiyo UNO, Hiroshi NAGAMI, Naotaka UEDA
and Yasuyuki UEDA

(Nara Prefectural Institute of Public Health:
57-6, Ohmori-cho, Nara, Japan)

Studies on a fractionation procedure using droplet counter-current chromatography (DCC) for food contamination monitoring have been carried out. The elution profile of components could be predicted from the partition coefficients by making use of simple Gaussian curves by the least-squares method using a microcomputer. Volumes of stationary phase, V_S , and mobile phase, V_M , could be measured directly in the case of DCC. The partition coefficient, K , of various compounds between the stationary phase and the mobile phase could also be obtained easily. Elution profiles, including retention volume, V_R , and peak width, W_i , from DCC could therefore be estimated when the partition coefficient alone is known. The following equations are proposed for fractionation of various chemical contaminants. $V_R = KV_S + d/2$, $F_i = m(V_M + V_i)/\sqrt{n} + d$, $F_{i+1} = (F_i - d)(2\sqrt{n} + m)/(2\sqrt{n} - m) + d$; where d is the injection volume, F_i is the volume of the i -th fraction, V_i is the center of the i -th fraction, n is the theoretical plate number, and m is an integer for $m\sigma$ separation.

(Received July 1, 1985)

Key words: 食品汚染物質 food contaminants; 有機リン系農薬 organophosphorous pesticides; 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides; モニタリング monitoring; 液滴型向流クロマトグラフィー (DCC) droplet counter-current chromatography (DCC); 溶出プロフィール elution profile; 最小二乗近似 least square fitting; 分画方法 fractionation manner

はじめに

前報で, DCC を用いて 種々の環境汚染物質と生物試

^{*1} GC/MS による食品中汚染物質のモニタリング (第 2 報)

^{*2} 奈良県衛生研究所: 奈良市大森町 57-6

料の脂質との分離, 精製を試み, 大量の試料を処理できることを報告した¹⁾. その場合に, DCC における固定相, 移動相間での分配係数から溶出プロフィールが予想できれば, すべての物質をいずれかの分画に帰属させることができ, あらゆる環境汚染物質を対象とした系統的

分離分画を容易に行うことが可能となる。従って、今回は環境汚染物質の合理的な分離分画方法を確立することを目的として、種々の化学物質の DCC 溶出プロフィールについての検討を行った。

実験方法

1. 装置及び操作条件

液滴型向流クロマトグラフ (DCC): 東京理化工機製 DCC-A 型, カラム管 3.4 mm id×40 cm ガラス製96本
操作温度 25°

ガスクロマトグラフ: バリアン社製 1400 型 (ECD),

(株)島津製作所製 GC-9A (FTD)

マイクロコンピュータ: (株)日本電気製 PC-9801 型
操作はすべて通常の方法, もしくは前報と同様に行った。

2. 試薬及び試験溶液

試薬及び農薬標準品は前報¹⁾と同じものを用いた。各種標準溶液は保存用 1,000 ppm 溶液を適宜希釈して用いた。DCC 展開用溶液はヘキサン-メタノール (2:1) 混液を振とう静置後上層を移動相, 下層を固定相として用いた。

Table 1. Chromatographic Parameters^{a)} of Droplet Counter-current Chromatography^{b)}

Compound	$V_R^{c)}$	$\sigma^{d)}$	$n^{e)}$	$N^{f)}$	$K(K^{-1})^{g)}$	$V_R/K(K^{-1})^{h)}$
Normal phase run (mobile phase; Hx)						
α -BHC	581	49.3	174	139	2.02	288
γ -BHC	657	58.8	153	125	2.35	279
Aldrin	237	29.7	107	64	0.667	356
Dieldrin	387	34.9	171	123	1.27	304
Endrin	350	33.9	161	112	0.958	366
Diazinon	512	41.4	197	153	1.42	361
Fenthion	559	46.5	183	145	1.60	350
Triolein	56	11.2	127	25	0.200	279
Cholesterol	340	36.5	126	87	0.830	410
Oleic acid	441	45.0	129	96	1.30	339
$\bar{m}$			153			333
S.D.			29			44
C.V. (%)			19			13
Reversed phase run (mobile phase; MeOH)						
α -BHC	164	20.8	126	62	0.494	332
β -BHC	53	16.4	56	11	0.141	379
γ -BHC	140	19.9	111	49	0.425	329
δ -BHC	94	13.5	148	49	0.195	486
Aldrin	481	55.1	100	76	1.50	321
Dieldrin	265	26.6	159	99	0.785	337
Endrin	299	28.2	172	113	1.04	288
Diazinon	188	17.3	222	118	0.704	267
Fenthion	168	19.4	151	75	0.626	269
Fenitrothion	101	14.0	149	52	0.420	241
Cholesterol	308	29.2	168	112	1.20	257
Oleic acid	221	25.1	134	77	0.750	294
$\bar{m}$			141			317
S.D.			41			67
C.V. (%)			29			21

^{a)} Calculated by least square fitting into simple Gaussian

^{b)} Methanol-hexane (2:1) was used as solvent system.

^{c)} Retention volume (ml), where void volume was canceled.

^{d)} Standard deviation of the peak

^{e)} Theoretical plate number

^{f)} Effective theoretical plate number

^{g)} Partition coefficient (K for normal phase, K^{-1} for reversed phase)

^{h)} Correspond to the volume of stationary phase

3. DCC 溶媒系での分配係数の測定

上層, 下層を 5 ml ずつ試験管にとり, そこに 10~100 μ l の標準溶液を加えて, 恒温水槽で 25° に保っておいてから振とうし, 静置後に両相から一定量をとって, GC, TLC デンシトメトリーを行い, クロマトグラムのピーク面積比から分配係数を測定した. これを 3 回繰返し, その平均値を採用した.

4. DCC の展開操作

前報¹⁾と同様の方法で行った. ただし, サンプルは移動相溶液に溶かして DCC にチャージした.

5. DCC 溶出プロファイルの再現

溶出プロファイルをガウス関数に近似して再現した.

$$V_R = KV_S + d/2 \quad (1)$$

$$P(V) = Q/\sqrt{2\pi} S \cdot \exp\{-(V - V_R)^2/2S^2\} \quad (2)$$

$$mS = m\sigma + d \quad (3)$$

ここで, V_R はリテンションボリューム, V_S は固定相容量, K は分配係数, d はインジェクションボリューム, $P(V)$ は成分の濃度, S はみかけ上の標準偏差, σ は真の標準偏差, m は整数である. 近似計算は (2) 式に最小二乗法を適用して行った.

結果及び考察

1. DCC 溶出プロファイルと装置の特性について

分取した各フラクションごとの濃度から計算によって再現されたクロマトグラムのパラメータを Table 1 に示した.

溶出位置すなわちリテンションボリューム V_R は分配係数と直線関係にあり, そして, K は実測可能であるため固定相容量 V_S は容易に決定することができる. カラム本数が 96 本するとき $V_S = 325$ ml であった. この値はカラム (3.6 ml/本) と連結用チューブ (0.5 ml/本) の内容積からポイドボリューム V_0 を減じた値ともよく一致する. すなわち, $3.6 \times 96 + 0.5 \times 97 - 65 = 333$. 従ってフェイズレシオ (β) は $325/65 = 5$ であって, カラム本数とは無関係である. ポイドボリューム V_0 は, 送液速度が 10~20 ml/hr では 60~70 ml であった. これは, 連結チューブの総容量が約 50 ml であり, 実際の移動相液滴の総容量が 10~20 ml であると解釈できる. このように, DCC ではクロマトグラムのパラメータがすべて明らかであり, 目的物質の分配係数も容易に実測できるため溶出プロファイルを容易に予想できる点で他のクロマトグラフィと異なる. このことは, すべての物質をいずれかの分画に容易に分類できるということであり, 環境汚染物質の系統的な分離分画を行う場合に好都合である.

2. 環境汚染物質の分離分画に適した DCC 溶媒系の選択

前報¹⁾の場合に用いたヘキサン-エタノール-水-酢酸エチル系では有機塩素系農薬相互の分離が劣っていた. 今回用いたヘキサン-メタノール系では無極性物質の分

Table 2. Standard Deviations of Stationary Phase Volume V_S

	$\bar{m}$ (ml)	S.D.	C.V. (%)
Normal phase ^{a)}	339	42.0	12.4
Reversed phase ^{b)}	299	31.1	10.4
Corrected ^{c)}	320	11.6	3.6

Following compounds common to normal phase run and reversed phase run were chosen for calcn of V_S : α -BHC, γ -BHC, aldrin, dieldrin, endrin, diazinon, fenthion, cholesterol, and oleic acid

$$a): V_{S_i}(\text{nor}) = V_{R_i}(\text{nor})/K_i$$

$$b): V_{S_i}(\text{rev}) = V_{R_i}(\text{rev})/K_i^{-1}$$

$$c): V_{S_i}(\text{cor}) = [V_{R_i}(\text{nor})/K_i + V_{R_i}(\text{rev})/K_i^{-1}]/2$$

離が良好であった. 動物性食品を扱う場合には, 脂肪組織との親和性の大きい無極性物質が多いためヘキサン-メタノール系の方が適している. なお, ヘキサン-アセトニトリル系では液滴ができず DCC には用いることができなかった.

3. DCC による環境汚染物質の分画方法について

多くの環境汚染物質を分離分画する場合には, 特定の物質を対象とする場合とすべての物質を複数の分画に振り分ける場合とがある. 後者の場合には, 1 つの分画に入る成分数を可能な限り少なくし, 分画数を無意味に多くしないことが必要である. すなわち, 1 成分がちょうど占める幅, ある成分について考えれば 2 つ以内の分画に入るようにする必要がある. DCC ではパラメータがすべて解っているため, 次のようにとりあつかうことができる.

リテンションボリューム V_R 及びピークの標準偏差 σ は次のように表わせる.

$$V_R = KV_S \quad (4)$$

$$\sigma = (V_M + V_R)/\sqrt{n} \quad (5)$$

ここで V_M は移動相容量, n はカラム理論段数である.

いま $m\sigma$ の幅で分画するとすれば, i 番目の分画のサイズ F_i は次のようになる.

$$F_i = m(V_M + V_i)/\sqrt{n} \quad (6)$$

ここで, V_i は i 番目の分画の中心である.

そして, 隣りあう分画の位置とサイズには次の関係がある.

$$V_{i+1} = V_i + (F_i + F_{i+1})/2 \quad (7)$$

(6), (7) 式から次式が導かれる,

$$F_{i+1} = F_i(2\sqrt{n} + m)/(2\sqrt{n} - m) \quad (8)$$

インジェクションボリューム d が十分に小さい場合には (8) 式に従って分画すればよいが, d が大きい場合には (9) 式を採用する必要がある.

$$F_{i+1} = (F_i - d)(2\sqrt{n} + m)/(2\sqrt{n} - m) + d \quad (9)$$

また、特定の物質を対象とする場合は、その物質の分配係数から予想される溶出位置 V_i を中心に次式で表わされるサイズとなる。

$$F_i = m(V_M + V_i) / \sqrt{n} + d \quad (10)$$

4. 分配係数について

分配係数の測定方法としては様々な方法が考えられるが、手軽に行える点から GC, デンシトメトリーで行った。数値は3回測定した平均値である (Table 1)。分配係数 K とリテンションボリューム V_R から計算した固定相容量 V_s の値には、 K の誤差によると思われるばらつきがみられる。しかし、順相と逆相では分配係数 K (K^{-1}) は互いに逆数であるため、両方法で得られた固定

相容量 V_s の平均値はばらつきが小さかった (Table 2)。従って、GC, デンシトメトリーで正確な分配係数を測定する場合には、さらに誤差を小さくする工夫が必要である。

DCC では分配係数さえ知ることができれば溶出プロフィールが予想できるのであるから、環境汚染物質を DCC 溶媒系での分配係数によって分類することが可能である。

文 献

- 1) 陰地義樹, 宇野正清, 谷川 薫: 食衛誌, 25, 310~316 (1984).