

## 6. ガスクロマトグラフィーによる定性・定量分析

### 【目的】

市販キシレン中の異性体の分離および同定、並びに未知混合物試料の同定と定量を通し、クロマトグラフィーを学ぶ。

### 【原理】

図 6-1 に一般的なガスクロマトグラフ装置の概略図を示す。吸着剤(固定相)を充填したカラムを恒温槽中で一定温度に保ち、カラムには展開剤となるヘリウムや窒素ガスなどを一定速度で流す。導入口より導入した試料は展開剤の流れと共にカラム中を移動する(移動相)。吸着剤と試料との親和性は成分毎に異なるので、各成分がカラムから流出するまでに要する時間が変わり、各成分が分離して流出する。この現象を用いて混合物を分離する方法をクロマトグラフィーといい、移動相が気体である場合を特にガスクロマトグラフィーという。

カラムより流出した成分の検出には目的によって様々な方法が採られているが、この実験では検出感度はそれほど高くないものの、ほぼ全ての物質を検出可能である熱伝導度検出器 (Thermal Conductivity Detector, TCD)を用いている。この検出器は、展開剤に試料成分が混ざると熱伝導度が変わることを利用し、展開剤のみが流れる参照カラムと本カラムからの流出ガスの熱伝導度の差を信号として出力する仕組みになっている。

検出器からの信号の出力例を図 6-2 に示す。カラム温度と展開剤の流量が適切ならば、図6-2 (a)のように、成分毎にほぼ三角形のピークが現れる。試料を導入してから各ピークが現れるまでの時間(保持時間, retention time)はほぼ一定であるので、別途既知の物質の保持時間を測定して比較することで、未知混合試料中の成分がおおよそ判定できる。また、各ピークの面積はその成分の量に比例するので、濃度が既知の試料とピーク面積の関係をあらかじめ調べておけば(検量線の作成)、未知試料中の成分濃度を測定することができる。

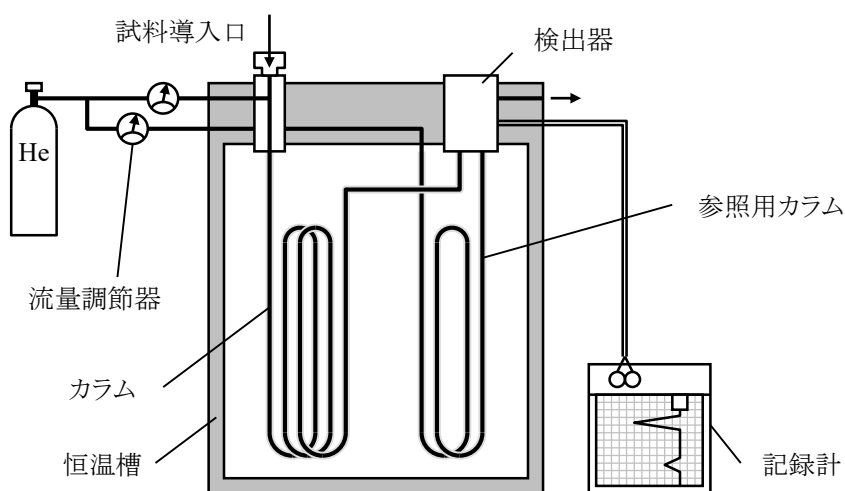


図 6-1 ガスクロマトグラフ装置概略図

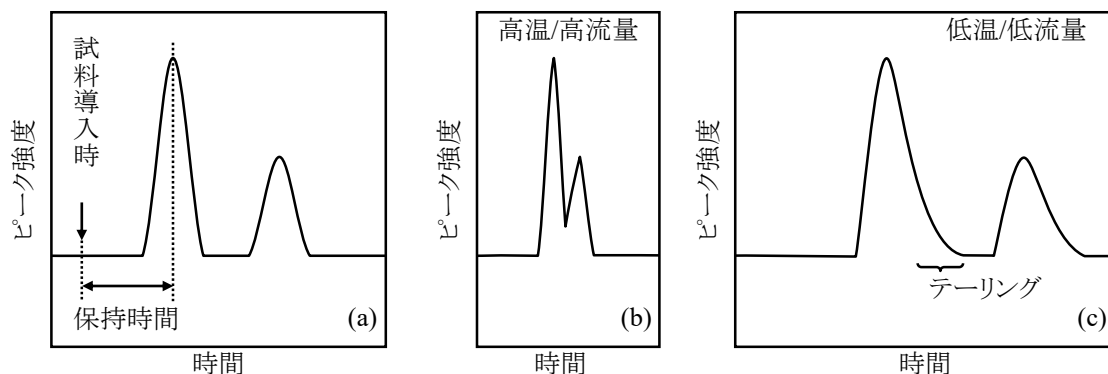


図 6-2 ガスクロマトグラム測定例(カラム温度による違い)

測定では、試料導入口、カラム、検出器の三カ所の温度を調整する必要がある。気体試料の場合はそのまま試料をカラムに導入すればよいが、液体(ときには固体)試料は加熱して気化させなければならない。そのため試料導入口は試料が気化するのに十分な温度に上げる必要がある。検出器の温度は、流出した成分の凝縮を防ぐため、カラムと同じか、それよりも20~30°C程高く設定する。カラム温度は高い方が短い時間で測定できるようになるが、クロマトグラムの分離能は下がる(図 6-2 (b))。逆に温度を低くすると分離能は上がるが、測定時間が長くなるだけでなくテーリングを生じてしまうため、正確な面積の測定が困難になってしまう。よって、カラム温度は適切な測定ができるように慎重に設定する必要がある。

#### 【予習課題】

予習レポートフォームに以下の課題についてまとめ、実験初日のはじめに提出すること。

1. クロマトグラフィーとはどういう手法であるか。
2. 種々のクロマトグラフィーの手法を、固定相と移動相の違いをもとにして分類せよ。
3. 保持時間について簡単に説明せよ。

#### 【所要装置, 器具, 薬品】

《コンテナ》			
メスフラスコ (5 cm <sup>3</sup> )	6,	マイクロシリンジ (10 μL)	1
ビーカー (100 cm <sup>3</sup> )	1,	キムワイプ	1
《机上》			
ガスクロマトグラフ装置	1,	記録計一式	1
ホールピペット (1 cm <sup>3</sup> ) (共用)	5,	安全ピペッター (共用)	5
駒込ピペット (5 cm <sup>3</sup> ) (共用)	2,	ノートPC	
キシレン(混合物)の2-プロパノール溶液	,	<i>o</i> -キシレン, <i>m</i> -キシレン, <i>p</i> -キシレン	
エチルベンゼン	,	2-プロパノール	

## 【実験】

Aを第1日目に、Bを第2日目にそれぞれ行う(次ページ)。実験にあたってガスクロマトグラフとマイクロシリンジの使用法をよく理解しておくこと。

### ガスクロマトグラフの起動

ガスクロマトグラフは、検出器からの信号が安定するまでにしばらく時間が掛かるため、立ち上げは午前中に教員・TAが行う。以下の全ての実験において、ガスクロマトグラフの使用条件は次の通りである。

試料導入口温度(INJ)		ヘリウムガス流量	: 50 cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup>
カラム温度(COL)	: 本体扉に	検出器電流	: 100 mA
検出器温度(DET)	記載	検出器の出力調整 (Attenuation)	: 4
使用カラム	: Bentone 34 5% + DIDP 5%, Uniport B 80/100 ステンレスカラム 4m × $\phi$ 3mm		

装置は島津GC-8A(図 6-3)を使用する。ガスクロマトグラフ本体を操作する必要は無い(全て設定済みである)が、測定までの基本的な操作手順は次の通りである。

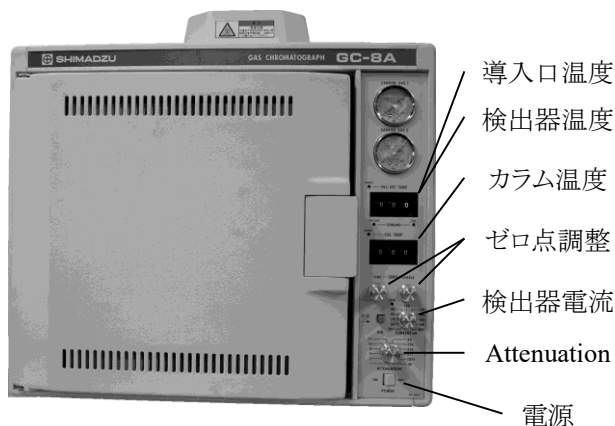


図 6-3 島津 GC-8A

1. キャリヤーガスを流す。キャリヤーガスは流量が50 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>になるように調整してある。
2. POWERスイッチをONにする。
3. INJ/DET TEMPとCOL TEMPを扉に示してある数値に設定する。
4. CURRENTを100 mAにする。
5. ATTENUATIONを4にする。
6. 別冊の「GC測定マニュアル」に従って記録を開始する。
7. 出力信号に変動が無く、ベースラインが水平になっていれば測定に移る。

#### A. キシレン異性体の分離と同定

1. ガスクロマトグラフの準備が整っていることを確認する。(設定を勝手に操作してはならない。)
2. 別冊の「GC測定マニュアル」, 下記のマイクロシリンジの使用法と使用時の注意を良く読み, 2-プロパノールを使って測定の練習を行う。
3. キシレン(混合物)の2-プロパノール溶液をメスフラスコに少量取り, 測定を行う。測定結果が正常か, 教員・TAに確認してもらってから次に進む。
4. *o*-, *m*-, *p*-キシレン, エチルベンゼン 2 cm<sup>3</sup>を各メスフラスコに取り, 2-プロパノールを追加して5 cm<sup>3</sup>とした溶液を調製する。
5. 各溶液のクロマトグラムを測定する。
6. 別冊の「GC測定マニュアル」と【データの解析法】を良く読み, キシレン(混合物)のスペクトルに現れた各ピークの同定を行う。

#### B. 未知混合物試料中の成分の同定と定量

1. ガスクロマトグラフの準備が整っていることを確認する。(設定を勝手に操作してはならない。)
2. 実験担当者より, 未知試料を受け取る。この未知試料は, *o*-, *m*-, *p*-キシレン, エチルベンゼンのうちいずれか二つが含まれている2-プロパノール溶液である。
3. 未知試料のクロマトグラムを測定する。
4. Aの実験結果を用いて未知試料中の物質を同定し, 実験担当者に正解を確認する。
5. 正解が確認できたら, 未知試料に含まれていた二つの物質についてそれぞれ, 2, 3, 4 cm<sup>3</sup>ずつメスフラスコに取って2-プロパノールで5 cm<sup>3</sup>に調製した溶液を用意する。
6. まずは, 同定した各物質の各濃度の溶液をまずは1回ずつ(計6回)測定する。未知試料については, B-3の結果を用いればよい。
7. 時間があるときは, 未知試料も含めて2回目, 3回目の測定を行う(それぞれ計7回)。
8. 濃度とピーク面積との検量線を作成し, 未知試料混合物中の各試薬の濃度を求める。

#### マイクロシリンジの使用法

1. 測定したい溶液を最大まで吸い上げ, それをビーカーに捨てる。この操作を3回以上繰り返してシリンジ内を共洗いする。
2. 単に溶液を吸い上げるだけだと, シリンジ内に気泡が残ってしまう。この気泡を抜くため, 針を溶液内に差し込んだままゆっくり吸い上げ, 素早く押し出しを繰り返すことで気泡はほぼ抜ける。非常に小さな気泡ならば, 針先を上に向けるだけで抜ける。
3. 気泡が抜けたならば, 溶液を少なくとも5  $\mu$ L以上は吸い上げ, そのまま装置の側まで移動する。
4. 針の付け根あたりにキムワイブを当て, 必要量(1  $\mu$ L)になるまで押し出す。
5. 針が曲がらないよう, 慎重に針を導入口1番に最後まで差し込む。決して, 2番の導入口に注入してはならない。
6. プランジャー(ピストン)を素早く押して溶液を注入し終わったら, シリンジを導入口より素早く抜く。この抜く動作と同時に, 記録を開始する。

### マイクロシリンジ使用時の注意

1. マイクロシリンジを巧く使うにはコツが必要なので、本測定の前に2-プロパノールを使って試し測定を行うこと。
2. マイクロシリンジの針先は鋭いので、手に刺さらないように注意すること。
3. マイクロシリンジの針はすぐに曲がってしまうので、ガスクロマトグラフの導入口に差し込むときは十分注意して行うこと。
4. 針が大きく曲がってしまったときは、その旨を教員・TAに申し出て、針を交換してもらうこと。

### ガスクロマトグラフの停止

1. 測定が全て終了したら、CURRENTを0にする。
2. INJ/DET TEMPとCOL TEMPの設定を000にし、恒温室の扉を開け、各部の温度が数十度程度に下がるまで待つ。
3. POWERスイッチをOFFにする。
4. キャリヤーガスを止める。
5. 適宜、セプタムを交換する。

### 【データの解析法】

#### A. 保持時間

保持時間とは、真の意味では試料が吸着剤に保持されている時間(カラムに入って出てくるまでの時間)のことになるが、それらの真の時間を知ることはできないので、試料注入時(記録開始時)から検出器の信号がピークに達するまでの時間を保持時間とすることが一般的である。図 6-4 における成分Aの保持時間 $\tau_A$ は、図中の左側の矢印部分になる。

こうして得られる保持時間は、物質ごとに常に同じ時間であるべきだが、測定条件のちょっとした違い(針を刺す長さ、試料の導入速度など)から記録開始時間とするものがずれるために、測定ごとにちょっとずつずれてしまうことが普通である。しかしながら、異なる成分間の間隔はずれることがほぼ無いので、未知試料の同定を行うときは、既知の試料と保持時間を比較するのではなく、相対保持時間を使って比較する方が好ましい。図 6-4 を例にすれば、図中の右側の矢印部分が成分Aを基準とした成分Bの相対保持時間 $\tau_{AB}$ である。

こうして未知試料の各成分の相対保持時間を求め(相対保持時間の基準となる成分は当然既知の物質)、それとその未知試料に含まれていると考えられる物質の相対保持時間を別途求め、それらを比較することで未知試料中の物質を同定することができる。しかしながら、物質の保持時間は必ずしも異なるとは限らないため、どのような物質が未知試料中に入っているのかおおよそ見当が付いていないと、この方法で同定することは困難である。

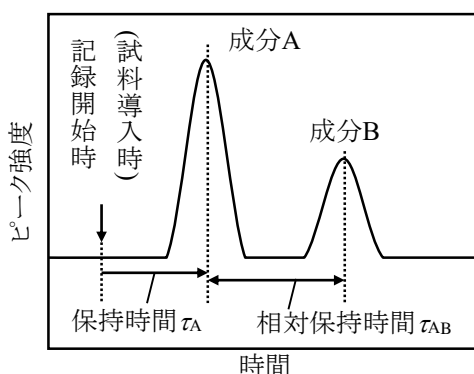


図 6-4 保持時間の求め方

## B. ピーク面積

得られたピーク面積と、その成分の注入した溶液中での濃度はほぼ比例する。よって、濃度とピーク面積との関係をあらかじめ求めておけば(検量線の作成)、ピーク面積から成分濃度を算出することができる。クロマトグラムのピーク面積を求める方法はいろいろ提案されていたが、現在ではコンピュータを使ってピークの面積を算出(積分)するのが一般的である。

### 【実験レポート】

1. 巻末のレポート用紙をプリントアウトし、これにデータを記入し、グラフと考察を加えてレポートをまとめる。巻末の用紙はレポートの1-2ページに対応する。
2. 以下の課題について考察し、別紙にまとめる。

### 【課題】

1. TCDという検出器の動作原理を説明せよ。
2. 保持時間とピーク形状との関連性を、実際に測定した結果から見いだせ。また、その傾向が生じる理由について述べよ。
3. 記録開始時間を基点とした保持時間が測定毎にズレる原因についてテキストでも簡単に述べてあるが、その原因をもっと掘り下げて述べよ。また、相対保持時間もズレる場合があるが、その原因についても述べよ。
4. 保持時間ではなく、相対保持時間を利用した方が正確である理由とは何か。
5. 定量分析の結果について考察せよ。
6. *o*, *m*, *p*-キシレンとエチルベンゼンが分離するのは、今回用いた吸着剤とのどういう相互作用によるものであるか。

## 6 ガスクロマトグラフィーによる定性・定量分析

レポート提出日： \_\_\_\_\_

実験者	学生番号：	氏名：	グループ番号：
-----	-------	-----	---------

共同実験者  
実験日

氏名： \_\_\_\_\_

年	月	日	曜日	気圧：	hPa	気温：	℃
年	月	日	曜日	気圧：	hPa	気温：	℃

欠席により共同実験者のデータを使用した場合、右にチェックを入れること。 1日目 2日目

☐
☐

### A. キシレン異性体の分離と同定

- ☆ 各溶液のクロマトグラムに現れた各ピークの保持時間（記録開始時を基点とする）を求める。
- ☆ ピーク番号は、保持時間の短いピークから番号を付けていくこととする。

#### 1. ガスクロの設定値

装置名		装置番号	
INJ/DET 温度	/	℃	記録計レンジ
COL 温度		℃	mV
検出器電流		mA	ヘリウム流量
			cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup>
			キャリアーガス圧力

#### 2. 保持時間

試料	Atten.	保持時間 / min					
		ピーク1	ピーク2	ピーク3	ピーク4	ピーク5	ピーク6
キシレン（混合物）							
<i>o</i> -キシレン							
<i>m</i> -キシレン							
<i>p</i> -キシレン							
エチルベンゼン							

#### 3. キシレン（混合物）の各ピークの同定

	ピーク1	ピーク2	ピーク3
同定物質			
相対保持時間 / min			
	ピーク4	ピーク5	ピーク6
同定物質			
相対保持時間 / min			
基準物質			

## B. 未知混合物試料中の成分の同定と定量

### 1. ガスクロの設定値

装置名		装置番号	
INJ/DET 温度	/ °C	記録計レンジ	mV
COL 温度	°C	ヘリウム流量	cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup>
検出器電流	mA	キャリアーガス圧力	

### 2. 保持時間

試料番号							
試料	Atten.	保持時間 / min					
		ピーク1	ピーク2	ピーク3	ピーク4	ピーク5	ピーク6
未知試料							

### 3. 未知試料の各ピークの同定

	ピーク1	ピーク2	ピーク3
同定物質			
相対保持時間 / min			
	ピーク4	ピーク5	ピーク6
同定物質			
相対保持時間 / min			
基準物質			

### 4. ピーク面積

物質X						
試料濃度/%	Atten.	ピーク面積/a.u.				
		測定1	測定2	測定3	平均	
物質Y						
試料濃度/%	Atten.	ピーク面積/a.u.				
		測定1	測定2	測定3	平均	
未知試料						
測定回数	Atten.	ピーク面積/a.u.				
		物質X		物質Y		
1回目						
2回目						
3回目						
平均						

### 5. 検量線と未知試料中の各成分の濃度 ☆ 検量線は別紙にまとめる

物質	試料濃度/%
X	
Y	

### 6. 考察 ☆ 別紙にまとめる



## 6 ガスクロマトグラフィーによる定性・定量分析（予習）

提出日： \_\_\_\_\_

実験者	学生番号：	氏名：	グループ番号：
-----	-------	-----	---------

1. クロマトグラフィーとはどういう手法であるか。

2. 種々のクロマトグラフィーの手法を、固定相と移動相の違いをもとにして分類せよ。

3. 保持時間について簡単に説明せよ。