

環境ホルモンと分取精製

科学機器事業部 中島 久子

1 はじめに

食品用の包装材や容器などに使用されている樹脂に含まれる微量成分が、ホルモン様作用を示す化学物質として食品中へ移行し、人体に影響を及ぼしているのではないかと、疑問視されている¹⁾。この検証には、ホルモン受容体レベル、細胞レベルおよび実験動物レベルの試験などを行い、生物学的評価を行う必要がある。その他種々の分野で利用されている化学物質に対して同様な問題が提起されているが確実なデータがなく²⁾、その検証が急務となっている。これら検証に必要な試験物質を得る方法として一般的に化学合成が想定されるが、合成が困難な場合や、ある純度以上の化合物が必要な場合に分取精製法が有効である。ここでは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分取精製について一般的な内容を紹介する。

2 HPLCによる分取精製法

クロマトグラフィーを用いた分取精製法としては、ガスクロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィー等が用いられてきたが、最近ではHPLCを用いる方法が汎用性があり効率のよい方法であるので多用されている。

2.1 分取システム

HPLCによる分取は目的成分(化合物)を高純度で得られる方法であるが、必要量を得るためには分取操作を多数回行う場合が多い。そのため一連の操作を自動的に行わせる自動分取装置を利用することが不可欠であり、自動分取装置として市販もされている。

自動分取装置は、大流量の溶媒を送液できるポンプ、試料液自動注入装置、分離カラム、分取用セルを備えた検出器、フラクションコレクター、これらを自動制御するシステムコントローラ

ーで構成されている。分取に用いるカラムサイズは、試料を大量に負荷し、処理効率をアップさせるため、内径の大きなものを用いるのが望ましい。分取用カラムの充填剤の粒子径は、分析用カラムに通常用いられる5 μ mを利用すると、分析時の分離パターンが再現でき、分取におけるスケールアップが容易となる(図1, 2, 3参照)。

2.2 分離モード

分離モードには、サイズによって分離するゲルクロマトグラフィー(GPC)や固定相との相互作用によって分離する吸着、分配、イオン交換クロマトグラフィー等がある。

吸着クロマトグラフィーの固定相には、シリカゲルや活性炭、アルミナ等があり、溶質の固定相への吸着力の差を利用したクロマトグラフィーである。移動相には、非極性や極性の小さ

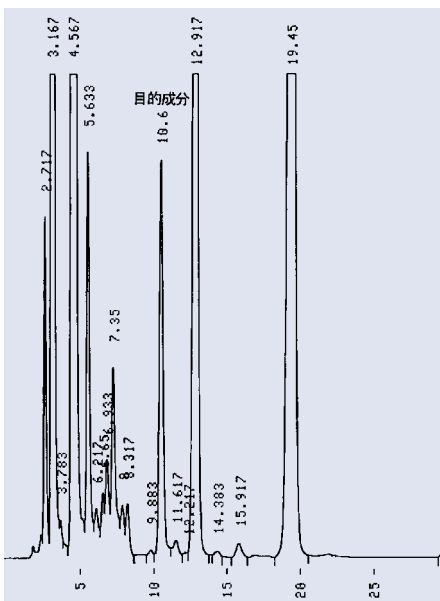


図1 分取試料

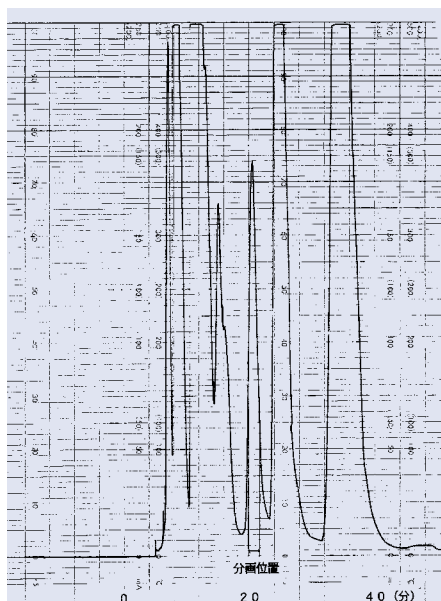


図2 SUMIPAX ODS JP(内径5cm×長さ25cm)を用いた分取クロマトグラム

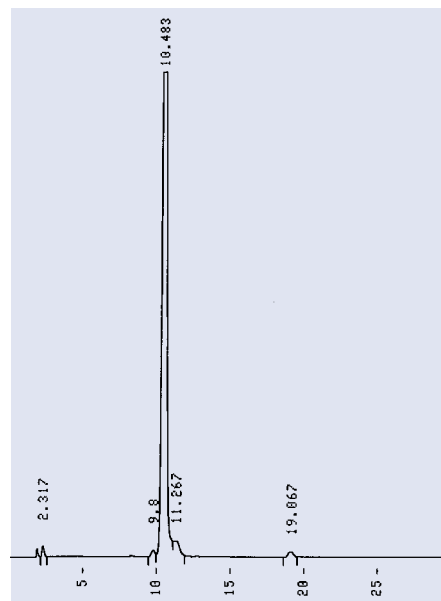


図3 分取精製品

な溶媒が使われる。移動相の選択次第で、広範囲の化合物に適應できる。

分配クロマトグラフィーとは、固定相担体の粒子表面に例えばオクタデシル基などの疎水性基を固定化し、移動相には水を主に用いる。溶質の固定相への吸着が強い場合は、アセトニトリルやメタノールを添加し、移動相への溶解力を増すことにより、分配比を調節し、分離溶出させるクロマトグラフィーである。極性化合物から無極性化合物まで、適應可能な化合物の範囲は広く、最も一般的に用いられる分離モードといえる。

イオン交換クロマトグラフィーとは、溶質のイオン性部位と、固定相のイオン交換基とのイオン交換能の差を利用するクロマトグラフィーで、移動相は水溶液で、イオン強度やpHを調整し、イオン交換の強さをコントロールし分離溶出させるクロマトグラフィーである。

以上のモードの中から、目的とする化合物が最も効率的に分取できる分離モードを選択する。

2.3 移動相の選択

移動相の選択は重要で、例えば吸着クロマトグラフィーのシリカゲルカラムでは、ヘキサンを主体とし、溶質の移動相への溶解力を高めるために、極性溶媒を添加した移動相を用いる。極性溶媒を添加することで、溶出時間の調整も行うが、添加する溶媒の種類で分離に影響を与える場合がある。ヘキサンに酢酸エチルを混合した系とヘキサンに2-プロパノールを混合した系で、相互分離を比較すると、異なる分離挙動を示すことがある。

分配クロマトグラフィーのODSカラムでは、水を主体とする移動相を用いる。一般的に用いられる水・アセトニ

トリル混合系と水・メタノール混合系とでは、異なる分離挙動を示すことがある。分取では、この違いを積極的に利用して、目的とする化合物が効率的に分離する移動相を選択する。

2.4 溶媒の選択

移動相に選択した溶媒に不純物が含まれていると、分取の過程で濃縮されることになる。例えば、フタル酸エステル類等は、通常の市販溶媒には微量ではあるが既に含まれていることが分かっている。フタル酸エステル抽出用溶媒として高純度溶媒が市販されているので、これらが利用できる。しかし、空気中にも存在しているため、開封後の混入も避け難い。生物試験を行う場合は、できる限りの高純度溶媒を用いると同時に、同一ロットの溶媒を用いて、同一分取操作を行ったブランク試料を調製し、有意差を確認することが必要である。

2.5 分取用試料の前処理

樹脂から目的成分を分取する場合、前処理として再沈法を行うことが多い。樹脂を溶解させる溶媒と、目的物質は溶けやすいが、他の成分の溶解力を極力おさえる溶媒を選択する。これらの溶媒も、含有される不純物に注意し、高純度溶媒を用いるようにする。

2.6 リサイクル分取法

分離モードや移動相を選択し、分取条件を設定する。しかし、多成分の中から目的とする成分の分離が困難な場合、リサイクル分取法が用いられる。通常に分取フローと異なる点は、カラムで分離し、検出器でピークとして検出後、切り替えバルブを用いて再度ポンプ、カラムへと送液する。カラムを複数回通過させることで、分離の向上

が可能である。ただし、ピークの広がりを見ると、3回程のリサイクルで一度分取するのが効率的である場合が多い。

3 おわりに

クロマトグラフィーを用いる分取精製は、複雑なマトリックスであっても、分析用HPLCで分離可能であれば、目的物質を短期間で高純度に精製できることに特徴があり、多くの目的に利用されている。光学異性体の取得のように一般的に純度の高い化合物を得るのが困難な分野においても、HPLC用の光学活性カラムが多数開発されている現状ではHPLC分取により比較的容易に取得できる。また、必要量に応じて、スケールアップができるので、質・量ともに、内分泌攪乱化学物質の検証試験に必要な物質をタイミングよく調製することが容易である。目的物質を得た後の生物活性試験や構造解析等は脚光を浴びることが多く、それに対して分取精製は地味ではあるが不可欠の技術であり、クロマトグラフィーの条件設定は、非常に微妙かつ複雑であり、知恵を絞り、経験を生かせる味のある興味深い分野である。

文 献

- 1) 河村葉子：ファルマシア，1999，229．
- 2) 神沼二真：ぶんせき，1999，151．



中島 久子
(なかしま ひさこ)
科学機器事業部