

薄層クロマトグラフィーの実験と段理論

笹 村 泰 昭*

On the experiment of thin layer chromatography and the plate theory

Yasuaki SASAMURA

要 旨

学生に“分配クロマトグラフィー”の概念を理解させるための薄層クロマトグラフィーの実験とやさしい段理論について解説した。

Synopsis

The plate theory of the chromatography was described. The experiment of thin layer chromatography was effective to study “Partition Chromatography”.

1. は じ め に

分配クロマトグラフィーを薄層クロマトグラフィーの実習と段理論のやさしい計算を通じわかりやすく解説した。

今日広く使われているクロマトグラフィーは、M.Tswettの植物色素の分離¹⁾にその基礎がある。それ以来クロマトグラフィーは専ら液体クロマトグラフィー (LC) がその中心であった。その後、A.MartinとR.Syngeがクロマトグラフィーに「分配」の概念を導入し²⁾さらにそれに基づいてA.JamesとA.Martinがガスクロマトグラフィー (GC)を創始した³⁾。優れた検出器が考案される⁴⁾やクロマトグラフィーの様相は一変し研究室などにまたたく間にGCが普及した。1969年に至り、J.Kirkland⁵⁾が高压に耐える液体クロマト用充填剤をつくり短時間で分析が可能になるや、分析対象の広い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が脚光を浴び、今日ではGC、HPLC共化学の研究室では無くてはならない分析機器として大いに利用されている。

本報ではクロマトグラフィーの分離の機構⁶⁾の中で比較的理解の難かしい「分配」という概念を

どのように学生に説明するかについて検討した結果である。クロマトグラフィー用のサンプルとして…自分達の手を汚して合成した…試料を選び、段理論も極くやさしい計算にとどめた。

2. 薄層クロマトグラフィー用サンプルと操作方法

梅沢はo-ニトロアニリンとp-ニトロアニリンとの分離を、活性アルミナを充てん剤とし、ベンゼンを展開溶媒としたカラムクロマトグラフィーで行っている⁷⁾。筆者も試み、学生実験に供してみたがクロマトグラフィーを理解する目的には非常に好ましいテーマ、装置であるが、時間がかかりすぎる難点があった。そこで薄層クロマトグラフィーの方が後述の段理論の説明には都合が良いことなどから次の様な操作方法を選んだ。まずサンプルは梅沢と同じくo-ニトロアニリンとp-ニトロアニリンの混合物を選んだ。ただしそれは学生が3年時の有機化学実験⁸⁾⁹⁾で合成済みのアセトアニリドのニトロ化物をさらに加水分解して得た試料である。それらのガスクロマトグラムは図-1、2で図-1は関連する6成分の等モル溶液、図-2は実際のニトロ化、加水分解時の過程をクロマトグラムで示したものである。数値

* 助教授 工業化学科

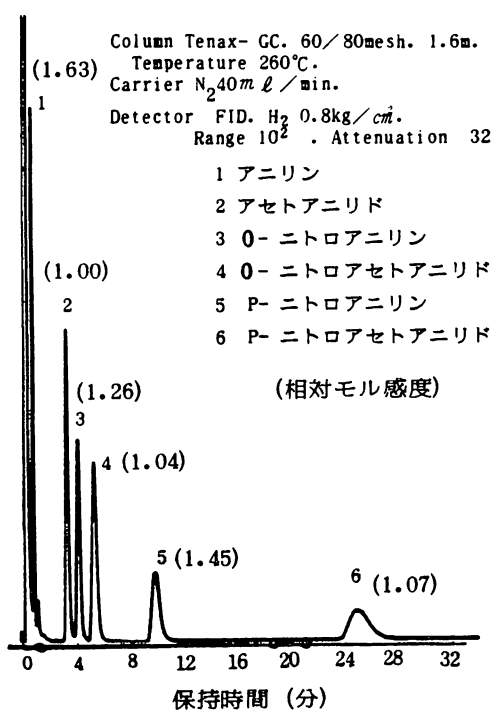


図-1 アセトアニリドのニトロ化反応関連物質の等モル (0.125 m モル/30 ml) 溶液のガスクロマトグラム

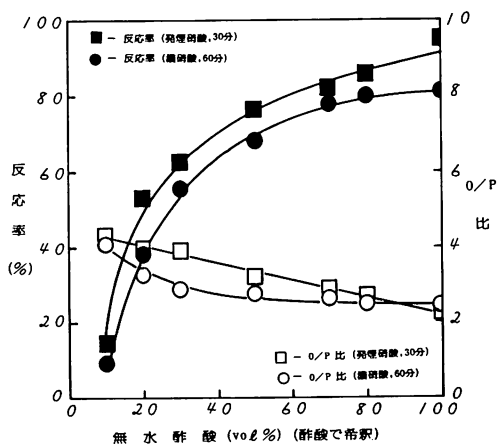


図-3 アセトアニリドのニトロ化反応無水酢酸濃度と反応率, o/p 比との関係

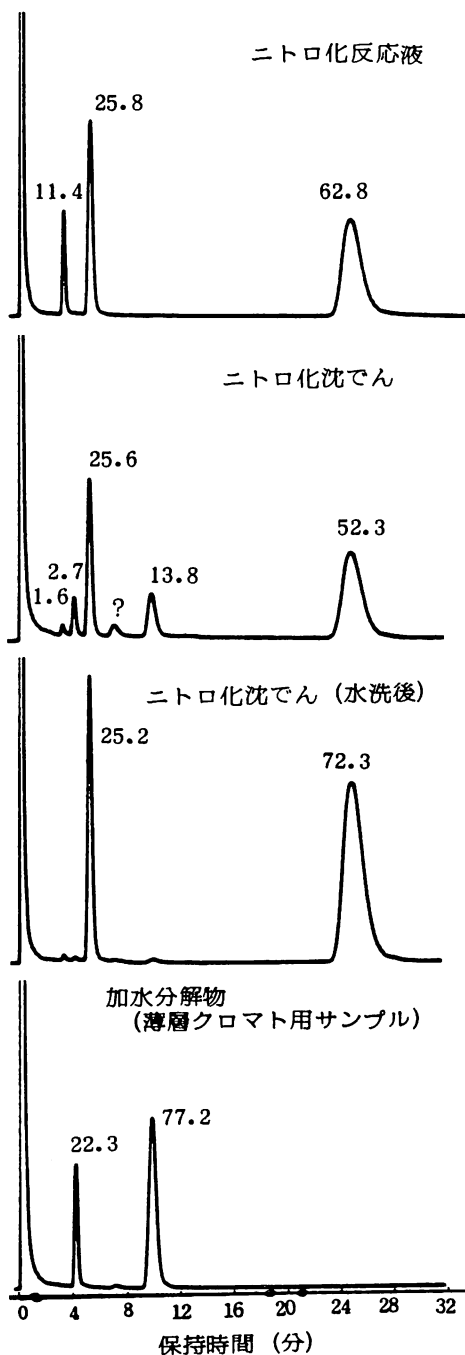


図-2 アセトアニリドのニトロ化, 加水分解生成物のガスクロマトグラム

はモル%である。

図-3は0-ニトロ体を多く必要とする場合の溶媒について調べた結果である。

図-4に本実験用のニトロ化、加水分解の操作手順をフローシートで示した。

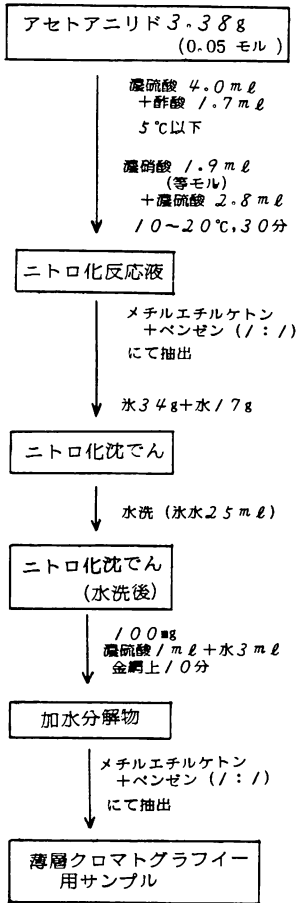


図-4 薄層用サンプル作成手順

薄層プレートは5 cm×20 cmのガラスプレートでシリカゲルはワコーゲルB-5を用いた。薄層の厚さは0.25 mmで通常の方法で作成した。展開層は某メーカーのインスタントコーヒーの空ビンが適当で高価な展開層を購入しなくても20班(2人1組)同時に利用できた。展開時間は約30分で、溶媒のベンゼンは10 cm位まで上昇する。結果を図-5に描いた。R_f値は0-ニトロアニリン0.6、p-ニトロアニリンの0.3で分離は充分であった。

両物質とも黄色く着色しているので展開中、次第に分離してゆく様子が手にとるように自分の目で直接確めることができた。また発色試薬を噴霧

することも不必要で好都合であった。この薄層クロマトグラフィーは原理、分離機構からは吸着が主と考えられ、特に“分配”ということ意識させることはできないが、次の段理論の説明の際にはこの実習の経験が役立つ。

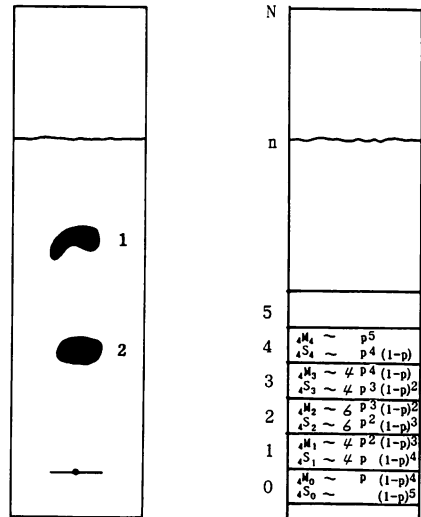
机の上での勉強あるいは耳からの語だけで「クロマトグラフィー」を考えるのではなく、まず体験させることを主な目的とした。ペーパークロマトグラフィーについても種々の溶媒を検討し、エチルエーテルが多少分離できる傾向を示したが学生の実習に取りあげるところまでには至らなかった。濾紙の方が、水とベンゼン(その他の有機溶媒)への分配を説明しやすいかも知れない。

3. やさしい段理論計算

A. Jamesらの原報³⁾に「分配」という概念に基づく段理論の計算が載っている。本報では主にやさしく書かれた実験書¹⁰⁾を参考にした。まず2.の実験での薄層をN段のプレート(高さh)に分けることを想定する。

この想定は薄層プレートを取り扱った経験が無ければ難しく、本を見たり耳で聞いたりしただけではなかなか想像できない。

固定相(シリカゲル層)にS(stationary phase)、移動相(ベンゼン)にM(mobil phase)のサフィクスを用いる。



1~0-ニトロアニリン
2~p-ニトロアニリン

図-5 O-, P-ニトロアニリン薄層クロマトグラフィー

図-6 段理論による計算結果

さらに

- (1) 全ての相で2相の割合が一定
- (2) 移動相の流れが均一
- (3) 溶質分子の軸方向への拡散が起らない
- (4) 2相間の溶質の分配は常に瞬時に平衡に達する
- (5) 溶質の濃度に関係なく分配係数が一定である、を仮定する。そして薄層プレートに溶媒によって運ばれてゆく試料（ α -ニトロアニリン、 p -ニトロアニリン）を、次の様な計算でその移動の様子を追ってみる。

最初の状態0の時、第0段目の相に試料が添付されたばかりにある一定の割合 μ で固定相と移動相に分配される。この時の固定相はシリカゲルに含まれている水分と考える。次に、状態1の時、試料の一部は移動相と共に第一段目に移行する。状態0の時の様子を数式で表わすと

$${}_0S_0 + {}_0M_0 = Q \quad \dots(1)$$

$${}_0S_0 / {}_0M_0 = \mu \quad \dots(2)$$

$$(1), (2) \text{より } {}_0S_0 = (1-p)Q, \quad {}_0M_0 = PQ$$

ただし $P = 1/(1+\mu)$ で μ は両相への分配比である。

状態1の時は第1段目に移行して来た試料の一部 ${}_0M_0$ は再び瞬時に第1段目の両相に分配される。

すなわち1段目では

$${}_1S_1 + {}_1M_1 = {}_0M_0 = PQ \quad \dots(3)$$

$${}_1S_1 / {}_1M_1 = \mu \quad \dots(4)$$

0段目では残った試料 ${}_0S_0$ が固定相と新しく移行して来た溶媒と共に分配され

$${}_1S_0 + {}_1M_0 = {}_0S_0 \quad \dots(5)$$

$${}_1S_0 / {}_1M_0 = \mu \quad \dots(6)$$

が成り立つ。(3), (4)より ${}_1S_1 = p(1-p)Q$, ${}_1M_1 = p^2Q$, (5), (6)より ${}_1S_0 = (1-p)^2Q$, ${}_1M_0 = p(1-p)Q$ となる。ここまでの計算ができれば、学生は分配の基本的な概念を理解したと見てよい。

この様にして各段の移動相が次々に押しやられ、固定相と移動相の試料の量が変化してゆく。 N 段に区切ったプレートを n 段目まで溶媒が上昇し、状態 n 、各プレート上の溶質の量を計算する。 $n=4$ の状態の計算結果を図-6に示した。 ${}_nS_r$, ${}_nM_r$ は n の状態の r 段目のプレートの固定相および移動相の溶質の量を表わす。係数は二項分布⁽¹⁾から連想できる。さらに計算を続けて見ると

状態 n の時の r 段目の溶質の量は

$${}_nS_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot p^r \cdot (1-p)^{n-r+1} \cdot Q \quad \dots(7)$$

$${}_nM_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot p^{r+1} \cdot (1-p)^{n-r} \cdot Q \quad \dots(8)$$

となる。従って r 段目のプレート上にある試料の合計 ${}_nT_r$ は

$${}_nT_r = {}_nS_r + {}_nM_r \text{ であるから}$$

$${}_nT_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot p^r \cdot (1-p)^{n-r} \cdot Q \quad \dots(9)$$

となる。すなわち各段に(9)式で示される量の試料が連続的に存在していることを表わしている。

(9)式より $\mu=0.5$ と 2.5 の場合 ($p=0.67$ と 0.29) について $n=10, 20, 30, 40, 50$ 段に区切った時の様子を図-7に示した。 $Q=1$ とした場合の(9)式の理論曲線⁽²⁾を表す。 $n=50$ にもなると充分分離しており、ピークの型状もなめらかで正規分布に近くなっている。(9)式の ${}_nT_r$ の値は二項分布表として National Bureau of Standards から出版されている。本報の計算と作図は全て HITAC-8250 と付属の X-Y プロッターを用いた。学生にはマイコンで計算し図を描かせるのも楽しいであろう。

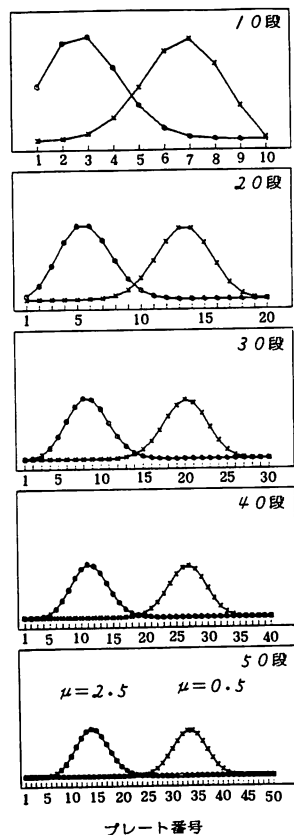


図-7 ${}_nT_r$ の理想曲線

クロマトグラフィーの定性に使われる R_f 値 (Rate of flow) は

$$R_f = \frac{\text{溶質の移動距離}}{\text{溶媒の移動距離}} = \frac{h \cdot np}{h \cdot n} = \frac{1}{1 + \mu} \quad \dots(10)$$

である。

np は(9)式の二項分布の値が最大になる時で $r = np$ の場合¹³⁾ である。

各段の両相の体積を v_s, v_m 溶質の濃度を c_s, c_m とすると $\mu = v_s c_s / v_m c_m$ であるから (10) 式は

$$R_f = \frac{1}{1 + (v_s / v_m) \cdot (c_s / c_m)} \quad \dots(11)$$

と書き変えることができる。 v_s / v_m は通常一定であるので R_f 値は $c_s / c_m = K$ すなわち分配係数によって決まることがわかる。

クロマトグラフィーで保持時間を物質の同定に用いる理由である。

4. ま と め

学生に「分配」クロマトグラフィーの概念を理解させる目的で

1) o-ニトロアニリンとp-ニトロアニリン混合物の薄層クロマトグラフィーによる分離

2) 段理論のやさしい計算

について解説した。1) では自分達の手を汚して合成した試料を用いることに意義があり、黄色に着色している物質であることがクロマトグラフィーの動的現象を理解するのに好都合であった。さらに薄層クロマトグラフィーを経験したうえで2) の段理論に話を進めてゆく。試料の分布を表わす nT_r の計算は本校でもマイコンが多数台備えられたので授業でも可能である。 μ, n を変えてグラフを描くのも楽しいであろう。

文 献 な ど

- 1) 原報は M.Tswett, Ber. deutsch. botan. Ges., **24**, 316 および 384 (1906) であるが文献 6) - a), b) に解説がある。
- 2) A.J.P.Martin, R.L.M. Synge, Biochem. J., **35**, 9 および 1358 (1941)
- 3) A.T.James, A.J.P.Martin, Analyst, **77**, 915 (1952), 同じく Biochem.J., **50**, 679 (1952)
- 4) 熱伝導度検出器 (TCD) が N.H.Rey, J.Appl. Chem., **4**, 21 (1954), 水素炎検出器 (FID) が J. Harley, Nature, **181**, 179 (1958) と I.G.McWilliam, R.A.Dewar, ibid, **181**, 760 (1958) に見られる。
- 5) J.J.Kirkland, J. Chromatog. Sci., **7**, 7 および 361 (1969), **8**, 309 (1970)
- 6) クロマトグラフィーに関する成書として
a) 桑田智著「クロマトグラフィー概論」広川書店 (昭和 41 年)
b) 波多野博行, 花井俊彦共著「実験高速液体クロマトグラフィー」化学同人 (1982 年)
c) 原昭二, 森定雄, 花井俊彦編著「クロマトグラフィー分離システム, 考え方, 選び方」丸善 (1981 年)
を特に参照した。
- 7) 梅沢純夫著「実験有機化学」丸善 (昭和 40 年)
- 8) 笹村・森田, 本校紀要, 第 14 号, 91 (昭和 54 年)
- 9) 笹村, 森田, 昭和 58 年東北地区化学教育研究協議会, 要旨集, p 14 (1983)
- 10) 日本分析化学会近畿支部編「機器分析実験法 (下)」p 428 (1965)
- 11) 本校の教科書では古屋「代数と幾何」p 174, 大日本図書 (1979)
上田他「確率と統計」p 75, 大日本図書 (1981) などにある。
- 12) 10) の p 498 にその例がある。
- 13) $nT_{np} / nT_{np-1} = 1 + 1/n(1-p) > 1$ および $nT_{np} / nT_{np+1} = 1 + 1/np > 1$ により説明している。
あるいは差をとっても証明できる。

(昭和 58 年 11 月 22 日受理)

