

# 実験で学ぶ化学

## II クロマトグラフィーによる分離分析

佐藤 真理・山口 則子

(Received January 11, 2006)

### はじめに

化学の研究と物質の分離分析とは不可分であり、物質の性質を知るにはまずその物質を単離して純粋にすることが求められる。分離分析法として多くの方法が確立されているが、ここでは、クロマトグラフィーによる分離分析を取りあげる。クロマトグラフィーは、生体を構成する分子のように互いによく似た性質をもつ化合物群から、わずかな性質の違いをもとに分子を分離することができる極めて有効な分離分析法である。

クロマトグラフ法は、多孔性媒体中を試料溶液が通過するとき、溶質に生じる移動速度の差を利用して、溶質の分離を行う。多孔性媒体を固定相といい、それに接して連続的に流れる液体（溶液）を移動相というが、この2相間に平衡状態が成立しているとき、溶液中に含まれて移動する試料成分（溶質）は、吸着や分配あるいはサイズ排除などの現象を経て、移動速度に差が生じ分離されていく。分離された各成分試料を検出して、定性あるいは定量分析を行う。この一連の操作がクロマトグラフィーによる分離分析である<sup>1a~1f)</sup>。分配による分離は、多段分配に基づくので分配係数が近い成分どうしても有効に分離でき、また、分離が単一の原理のみに支配されるのではないため、わずかな性質の違いをもとに分子を分離することが可能である。しかも少量の試料で比較的短時間で行なえるのでクロマトグラフ法は学生実験にとっても大変有効な分離分析法である。

多孔性の固定相としては、アルミナ、シリカゲル、セルロース、イオン交換樹脂、ゲルなどが用いられるが、分離の場である固定相の形状により薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーなどに分類される。薄層クロマトグラフィーの固定相の形状は、金属、プラスチック、ガラスなどの支持板にシリカゲルなどの固定相を均一な薄い層として塗布した薄層の形状である。一方、カラムクロマトグラフィーはガラスや金属製のカラムにゲルなどの固定相を充填したカラムの形状である。ここでは、固定相としてシリカゲル、セルロースを塗布した薄層プレートを用いる薄層クロマトグラフィー、および、ステンレスカラムにポリスチレンゲルを充填して用いるゲル浸透クロマトグラフィーの二つの方法により、以下の試料系について分離分析実験を試みた。

### I. 薄層クロマトグラフィー TLC (thin-layer chromatography)

1. 単糖および二糖類の分離分析
2. アミノ酸の分離分析
3. 核酸塩基およびヌクレオシドの分離分析
4. 金属イオンの分離分析

## II. ゲル浸透クロマトグラフィー GPC (gel permeation chromatography)

### 1. アルキルアルコールの分離分析

#### I. 薄層クロマトグラフィー TLC (thin-layer chromatography)<sup>1a~1c)</sup>

薄層クロマトグラフィーでは、金属、プラスチック、ガラスなどの支持板にシリカゲルなどの固定相を 0.2~0.3 mm 程度の薄い層として均一に塗布して用いるが、支持体と固定相が一体となったものを薄層プレートという。吸着剤であるシリカゲルを固定相とする薄層クロマトグラフィーでは、分離の主な原因は吸着現象である。固定相シリカゲルに吸着した溶質分子（吸着帯）の移動は、一つは溶質の吸着力の差に依存する。さらに、吸着帯中の溶質分子は、溶液中に溶存している同種の溶質分子との間に動力的な平衡状態にあり、吸着された溶質は溶媒の移動に伴って吸着-溶出-吸着を繰り返しながら移動する。このようなメカニズムでわずかでも性質が異なる溶質は、互いに異なった移動速度で薄層プレートを移動し、溶質分子は分離されると考えられる。

一定時間後に、展開剤が薄層プレート上の原点から移動した距離（最先端、単位 cm）に対する溶質分子の到達距離（cm）の比を  $R_f$  値（移動率\* retardation factor）という。 $R_f$  値は、展開剤、温度、プレートの種類などの条件を一定に保てば、一定値を示すことが多いので、この値を試料の分離、同定の目安にすることができる。（一般には、標準物質を試料と同時に展開させて  $R_f$  値を比較する。）溶質の化学的性質によっては、イオン交換現象が  $R_f$  値にかなり大きな影響を及ぼすことがある。

$$R_f \text{ 値} = \text{試料物質移動距離 (cm)} / \text{展開剤移動距離 (cm)}$$

薄層クロマトグラフィーは、色・形状などが似て外見からは互いに区別しがたい試料でも、薄層プレート上に着色したスポットとして明瞭に分離されて現れるので、実験者の感動を深める。ここで取りあげた薄層クロマトグラフィー実験の 4 テーマは、それぞれが互いによく似た性質の試料についてである。分離分析がごく微量の試料で可能なことも特筆すべきである。なお、試料系により薄層プレート、展開剤などの実験条件を適切に設定する必要がある。以下に、実験条件、操作、結果を記す。

### 1. 単糖類および二糖類の分離分析

Stahl が薄層クロマトグラフィーによる糖類の分析方法を確立 (1956) して以来、単糖類、二糖類、多糖類の分離分析は、試料量が少なく所要時間も長くない薄層クロマトグラフィーがよく用いられる。薄層クロマトグラフィーの分離能は、薄層上のシリカゲルの前処理と溶剤の選択により大幅に改善される。Hansen<sup>1b, 2)</sup> は、Stahl と Kaltenbach<sup>3)</sup> が確立した糖類の分離分析法を次のように改良した。すなわち、シリカゲルプレートをリン酸二水素ナトリウムで前処理をすることにより溶質の吸着を向上させ、さらに、溶剤に乳酸を加えることによりスポットの輪郭をより鮮明になるよう改良した。これにより薄層クロマトグラフィーによる単糖類、二糖類の分離分析はさらに向上した。

ここでは Hansen の報告<sup>2)</sup> に従って、単糖、二糖類の分離分析実験を行う。

### 器具試薬

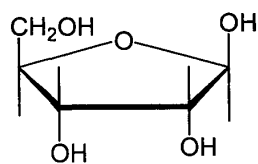
- (1) 試料：分離分析実験には、5種の単糖および3種の二糖を用いた。また、混合試料2種の分離を試みたが、いずれも二糖とそれ構成する単糖の混合試料である。試料はTable 1-1に、試料の化学構造式はFig. 1-1に示した。試料溶液は、濃度0.2%の水溶液である。混合試料は、これらの水溶液を等量混合して用いた。
- (2) 薄層プレート：TLC アルミニウムシート・シリカゲル60（蛍光指示薬含まず）Merck Art No5553, サイズ20×20 cm, 薄層の厚さ0.2 mm
- (3) 器具：薄層クロマト装置（ガラス製展開槽, ステンレス製ホルダー）, 噴霧器, メスシリンダー（100 ml）, ピペット（1, 10 ml）, ピペッター, ビーカー（50, 100, 1000 ml）, キャピラリー, 注射器, ドライヤー, 定温乾燥器, デシケーター, シャーレ, アルミホイル
- (4) 展開剤：イソプロピルアルコール（200 ml）, アセトン（200 ml）および0.1 mol/l 乳酸（100 ml）の混合溶液
- (5) 発色剤：アニリン（1 ml）, ジフェニルアミン（1 g）, アセトン（50 ml）および80%リン酸水溶液（7.5 ml）の混合溶液

### 実験操作

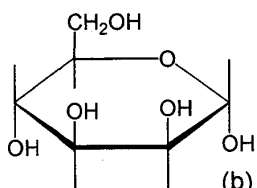
- (1) リン酸二水素ナトリウム ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 78 g を水 750 ml に溶かし、メタノール 250 ml を加えて、0.5 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液をつくる。この水溶液中にシリカゲルプレート（サイズ20×20 cm, Merck Art. No5553）を入れ、シリカゲルプレート全体に溶液が十分しみ込むよう15～20時間浸漬する。この実験では、浸漬時間が約17時間半である。
- (2) シリカゲルプレートを溶液から取り出して後、垂直に立てて風乾、次いで定温乾燥器中約105℃で60分間乾燥し、デシケーターに移して室温まで下げる。
- (3) 試料の単糖、二糖は、それぞれ20 mg を10 ml の水に溶かして0.2%濃度の水溶液とし、シリカゲルプレートの下端から3 cm の位置にキャピラリーを用いて塗布し、溶質が固定相のシリカゲルにしみ込むように溶媒（水）を蒸発させる。なお、混合試料の測定では各成分もプレート上に隣り合わせて塗布した。
- (4) 薄層クロマト装置の展開槽に展開剤を入れ、溶媒で飽和した状態になってから、シリカゲルプレートを立てて入れ、蓋をしっかりとる。展開剤は、使用直前に3種類の溶剤すなわち、イソプロピルアルコール、アセトンおよび0.1 mol/l 乳酸を混合して用いた。展開槽中の展開液の量は、シリカゲルプレートの下端が1.5 cm ぐらい浸る程度である。
- (5) 展開剤はシリカゲルプレートをゆっくり上昇し、4時間経過してほぼ16 cm まで上昇した。ここで展開槽からシリカゲルプレートを取り出し、約60℃の温風で乾かした。展開剤移動距離は16.0 cm であった。
- (6) シリカゲルプレートに褐色ガラス製の噴霧器を用いて発色剤を噴霧する。
- (7) プレートを105℃の乾燥機で30分間熱する。ややあって白いシリカゲルプレート上に、糖の存在を示す着色したスポットが現れる。始めに試料溶液を置いた原点から各スポットの中心点までの距離を各試料の移動距離として測定した。

Table 1-1. Samples of mono- and disaccharides and the mixtures.

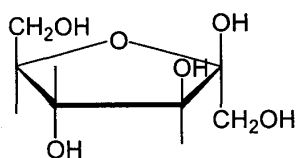
Monosaccharide	(a) D-Ribose (D-リボース)
	(b) D-Mannose (D-マンノース)
	(c) D-Fructose (D-フルクトース, 果糖)
	(d) D-Glucose (D-グルコース, ブドウ糖)
	(e) D-Galactose (D-ガラクトース)
Disaccharide	(f) Sucrose (スクロース, ショ糖)
	(g) Maltose (マルトース, 麦芽糖)
	(h) Lactose (ガラクトース, 乳糖)
Mixture 1	(f) Sucrose, (c) D-Fructose and (d) D-Glucose
Mixture 2	(h) Lactose, (d) D-Glucose and (e) D-Galactose



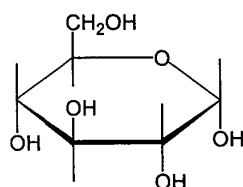
(a) D-Ribose



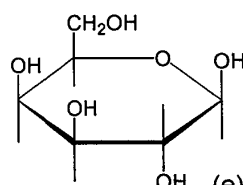
(b) D-Mannose



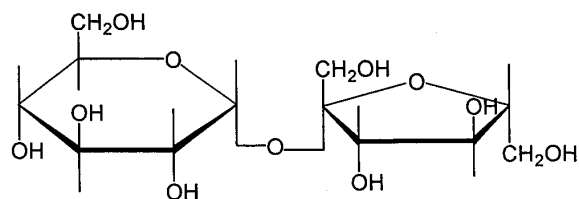
(c) D-Fructose



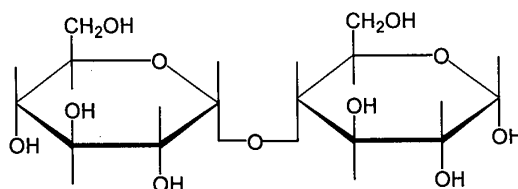
(d) D-Glucose



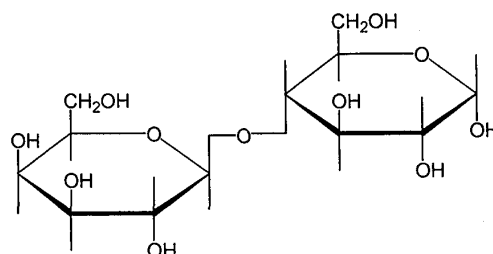
(e) D-Galactose



(f) Sucrose



(g) Maltose



(h) Lactose

Fig. 1-1. Structural formulas of mono- and disaccharides

## 結果と考察

実験の結果は、Fig. 1-2 のクロマトグラムに示したとおりである。クロマトグラムのスポットは明確であり、展開剤中の乳酸の効果を確認される結果であった。Table 1-2 には、各試料について移動距離、 $R_f$  値、発色の色をまとめて示した。表には、Hansen による  $R_f$  値も示した。その値と比較すると本実験の試料物質の移動距離は、Hansen の報告に比べてやや小さく、特に二糖類の移動距離が小さい結果であった。シリカゲルプレートをリン酸二水素ナトリウム水溶液により処理は行ったが、その効果を十分引き出せなかったよう

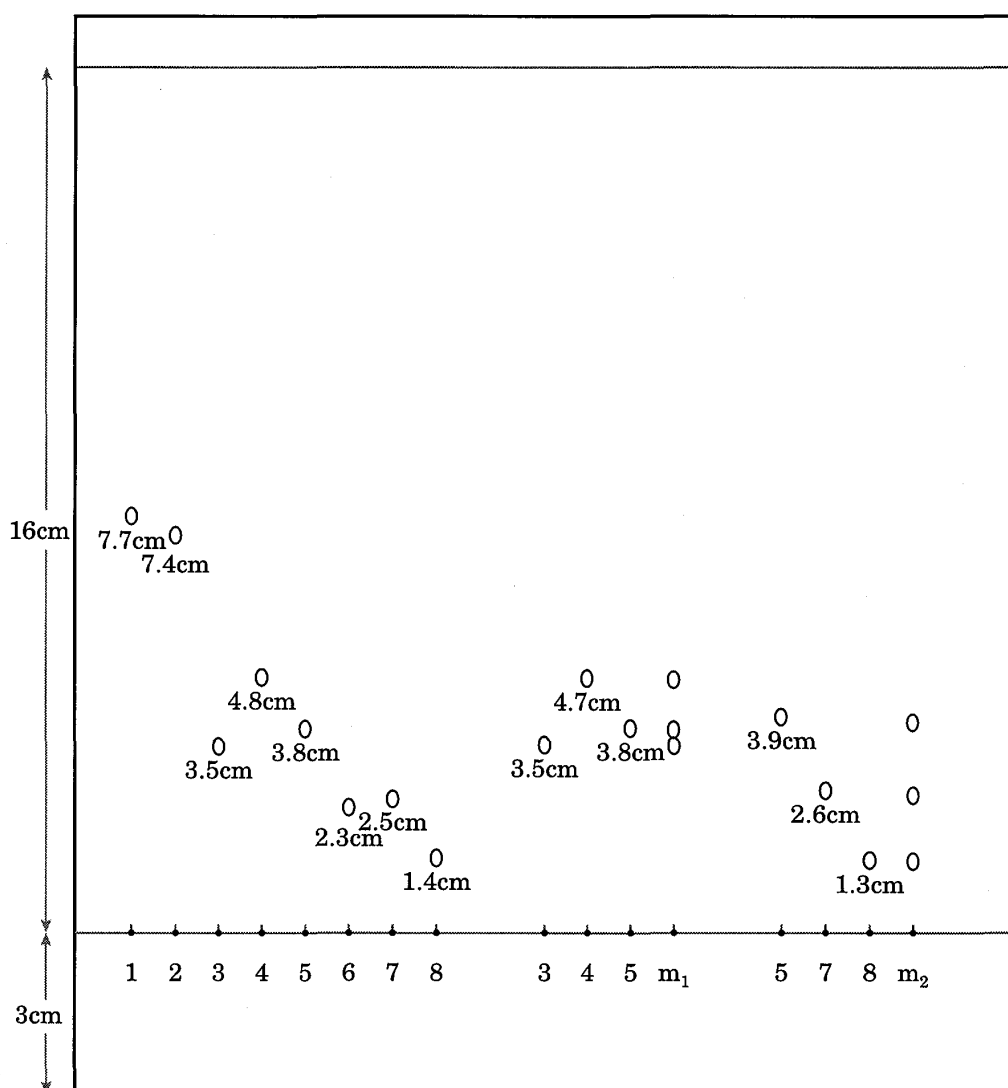


Fig. 1-2. Chromatogram of mono- and disaccharides on 20×20 cm pre-coated TLC silica gel 60 plate impregnated with  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Solvent system, acetone-isopropyl alcohol-0.1 M lactic acid: spraying reagent, anilin-diphenylamine-acetone-80% $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Samples, (1) D-ribose, (2) D-mannose, (3) sucrose, (4) D-fructose, (5) D-glucose, (6) maltose, (7) D-galactose, (8) lactose, ( $m_1$ ) mixture 1 (3, 4 and 5), ( $m_2$ ) mixture 2 (5, 7 and 8).

Table 1-2.  $R_f$  values and coloration of mono- and disaccharides on silica gel 60 impregnated with  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Saccharide	Migration length (cm)	Color	$R_f$ value	$R_f$ value*
Ribose	7.7	violet	0.48	0.60
Mannose	7.4	blue	0.46	0.50
Sucrose	3.5	violet	0.22	0.47
Fructose	4.8	red	0.30	0.46
Glucose	3.8	blue	0.24	0.41
Maltose	2.3	blue	0.14	0.34
Galactose	2.5	blue	0.16	0.30
Lactose	1.4	blue	0.09	0.23

\* S. A. Hansen, J. Chromatogr., **107**, 224 (1975).

である。しかし、測定の実現性はよく、例えば3回測定したグルコースの場合、移動距離は3.8 cm ( $R_f$  値が0.23<sub>8</sub>)、3.8 cm, 3.9 cm ( $R_f$  値が0.24<sub>4</sub>)、とよく一致した。また、糖を識別するには十分な移動距離の差が認められた。混合試料1では、スクロースとグルコースの移動距離が近く、スポットが接近したが、この場合は発色剤により発色させたスポットの色の違いが、試料の識別を確かなものとした。

## 2. アミノ酸の分離分析

アミノ酸の分離分析にはペーパークロマトグラフィーが古くから用いられ、たんぱく質の構造研究に貢献し発展してきた。ペーパークロマトグラフィーは固定相にロ紙を用いる方法であるが、薄層クロマトグラフィーでは固定相に薄層を用いることにより、迅速、鋭敏、再現性という薄層の長所を活かし分離同定に応用できる。薄層としては、アルミナ、シリカゲル、セルロースなどが用いられるが、もっとも用いられるのはシリカゲルである<sup>1a)</sup>。ここでは、3種のアミノ酸、グリシン、L-バリン、L-ロイシンについてプラスチックの支持板にシリカゲルを固定相としたシリカゲルの薄層プレートを用いて分離分析実験を行う。

### 器具・試料

- (1) 試料: グリシン, L-バリン, L-ロイシンの各5%水溶液  
試料の構造式は Fig. 2-1 に示す。
- (2) 薄層プレート: 薄層クロマトグラフィー用スポットフィルム S196 (東京化成)
- (3) 器具: 500 ml トールビーカー, ガラスキャピラリー, アルミホイル, メスシリンダー, 噴霧器, 定温乾燥器
- (4) 展開剤: *n*-ブチルアルコール (40 ml), 氷酢酸 (10 ml), 水 (20 ml)
- (5) 発色剤: ニンヒドリン-0.4% *n*-ブチルアルコール溶液

## 実験操作

- (1) 500 ml のトールビーカーに展開剤を入れる。
- (2) プレートの下端より 1.5 cm (原線) と 11.5 cm のところに鉛筆で薄く線を引く。
- (3) ガラスキャピラリーを用い、原線上に 1 cm おきに試料溶液を塗布する。試料溶液は直径 2 mm 位の円形スポットになるようにする。
- (4) 2～3 分風乾後、トールビーカーの中にたてかけ、ビーカーの上端をアルミホイルでしっかりと覆う。
- (5) 試料の塗布されている原線まで展開剤が上昇したら展開開始とする。
- (6) 展開剤が上部の線に到達したら、ただちにプレートを展開剤から取り出す。
- (7) プレートが乾燥したら、ニンヒドリン 0.4% 溶液を吹き付けて、数分間乾燥機中 (90～100℃) で加熱する。
- (8) アミノ酸の紫色のスポットが現れたら原点から各スポットの中心までの距離を測り、各試料の  $R_f$  値を求める。

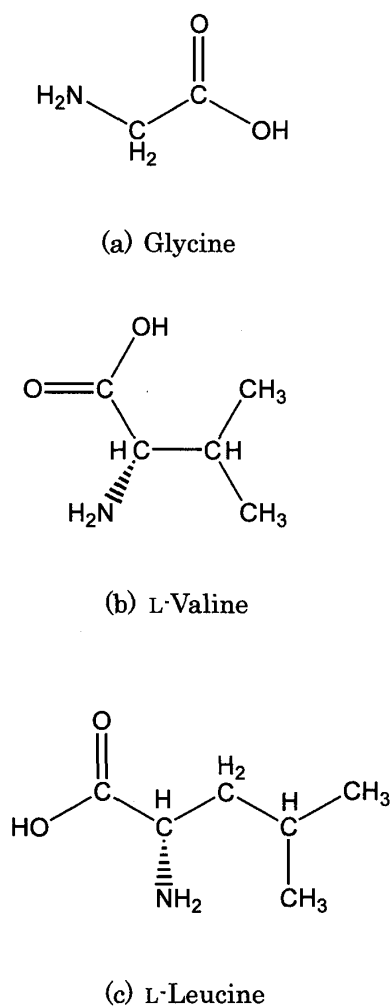


Fig. 2-1. Structural formulas of glycine, L-valine and L-leucine.

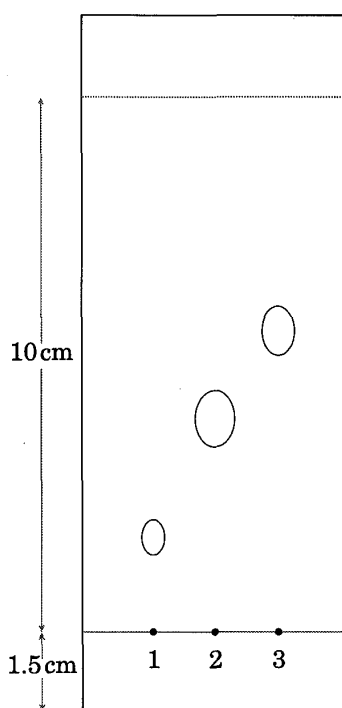


Fig. 2-2. Chromatogram of amino acids on silica gel plate. Solvent system, *n*-butyl alcohol-acetic acid-water: Spraying reagent, ninhydrine-0.2% butyl alcohol. Samples, (1) glycine, (2) L-valine, (3) L-leucine.

### 結果と考察

実験の結果は、Fig. 2-2 に示した。三つの赤紫のスポットが現れ、 $R_f$  値はそれぞれ、0.18 (グリシン)、0.40 (L-バリン)、0.56 (L-ロイシン) である。一番移動距離の大きいのは、L-ロイシンであり、次にL-バリン、もっとも移動距離の小さいのはグリシンである。展開溶媒に対する親和性の大きな物質ほど展開速度が大きくなり移動する。展開溶媒は、酢酸と *n*-ブチルアルコールを含む溶媒であるので、酸性条件で疎水性の大きな物質ほどよく展開されることになる。Fig. 2-1 にそれぞれの分子構造を示したが、側鎖の炭素数が多い L-ロイシンが最も移動距離が長く、次に L-バリン、さらにグリシンの順である。10 cm の展開には約 3 時間を要する。

### 3. 核酸塩基およびヌクレオシドの分離分析

核酸およびヌクレオシドの分離分析には、セルロース、イオン交換セルロースなどの薄膜を用いるとよく分離されることが知られている<sup>1a)</sup>。ここでは、プリン塩基のアデニン、ピリミジン塩基のシトシン、チミン、ウラシル、および、ヌクレオシドのアデノシン、ウリジンについてプラスチックの指示板にセルロースを固定相とした薄層プレートを用い分離分析を試みる。

#### 器具・試料

- (1) 試料：アデニン、ウラシル、チミン、シトシン、アデノシン、ウリジン  
試料の構造式は Fig. 3-1 に示す。
- (2) 薄層プレート：薄層クロマトグラフィー用スポットフィルム S151 (セルロース DEAE) (東京化成)
- (3) 器具：200 ml トールビーカー、ガラスキャピラリー、アルミホイル、メスシリンダー
- (4) 展開剤：水
- (5) 検出方法：紫外線 (254 nm) 照射による。

#### 実験操作

- (1) 200 ml のトールビーカーに展開溶媒を入れる。
- (2) プレートの下端より 1 cm (原線) と 6 cm のところに鉛筆で薄く線を引く。
- (3) ガラスキャピラリーを用い、原線上に 1 cm おきに試料溶液を塗布する。  
試料溶液は直径 2 mm 位の円形スポットになるようにする。
- (4) 2~3 分風乾後、トールビーカーの中にたてかけ、ビーカーの上端をアルミホイルでしっかりと覆う。
- (5) 試料の塗布されている原線まで展開溶媒が上昇したら展開開始とする。
- (6) 展開剤が上部の線に到達したら、ただちにプレートを展開溶媒から取り出す。
- (7) プレートを風乾後、短波長の紫外線 (254 nm) でスポットを検出し、原点から各スポットの中心までの距離を測り、各試料の  $R_f$  値を求める。



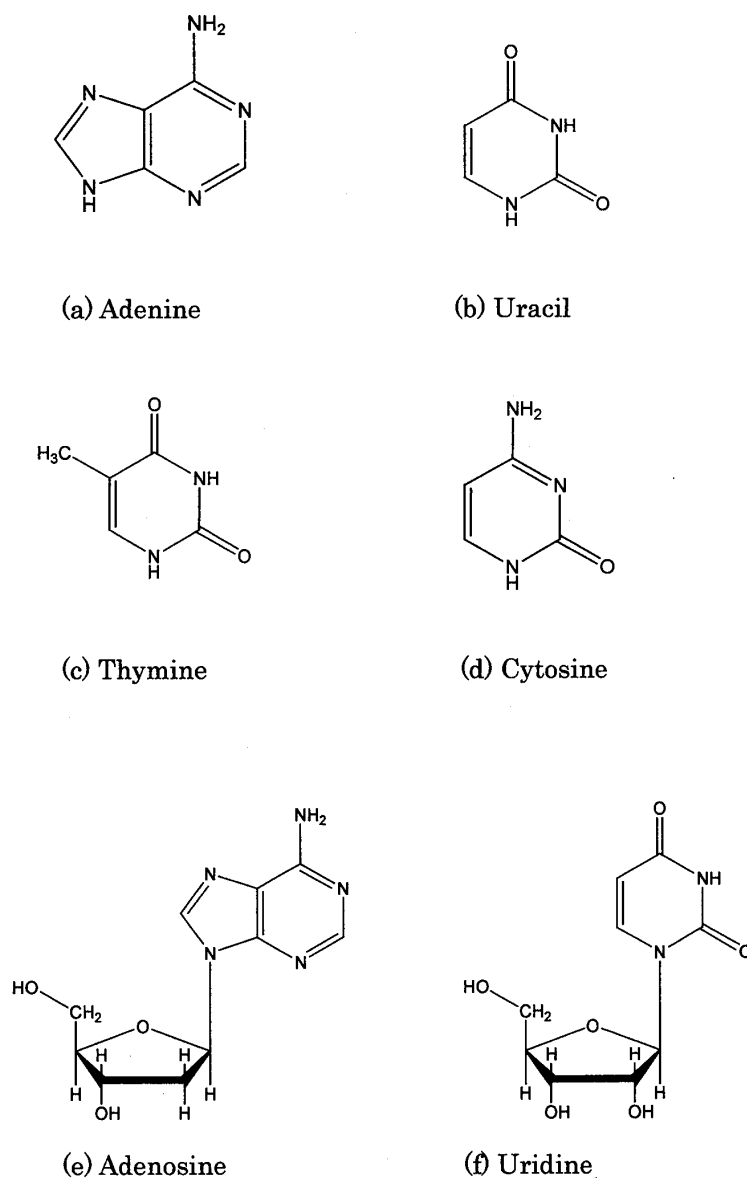


Fig. 3-1. Structural formulas of prine, pyrimidines and nucleosides.

### 結果と考察

セルロース DEAE の薄膜を用いて分離した 6 種の試料の  $R_f$  値を Table 3 に示した。展開時間を 25, 45, 90 分と変えて行ったが、25 分展開で、溶媒移動距離は約 5 cm, 45 分で約 7 cm, 90 分で約 10 cm である。展開時間が変わっても  $R_f$  値にあまり変化は見られない。90 分展開中、移動距離の長いウラシル、ウリジンなどはスポットがぼやけてしまうため検出にくい。スポットを大きくするとテーリングし、少量塗布であれば展開中にスポットが消えてしまうなどの問題が生じる。25 分展開で十分分離されて、しかもスポットが鋭敏であることから、これらの場合には少量の試料塗布で短時間展開がよいように思われる。Fig. 3-2 には 25 分展開のクロマトグラムを示した。TLC 上で核酸塩基とヌクレオシドは明白に分離されていることがわかる。

Table 3.  $R_f$  values of prine, pyrimidines and nucleosides.

	25 min	45 min	90 min
Adenine	0.23	0.24	0.23
Uracil	0.72	0.76	0.69
Cytosine	0.48	0.52	0.52
Thymine	0.73	0.72	0.68
Adenosine	0.44	0.45	0.45
Uridine	0.88	0.81	0.83

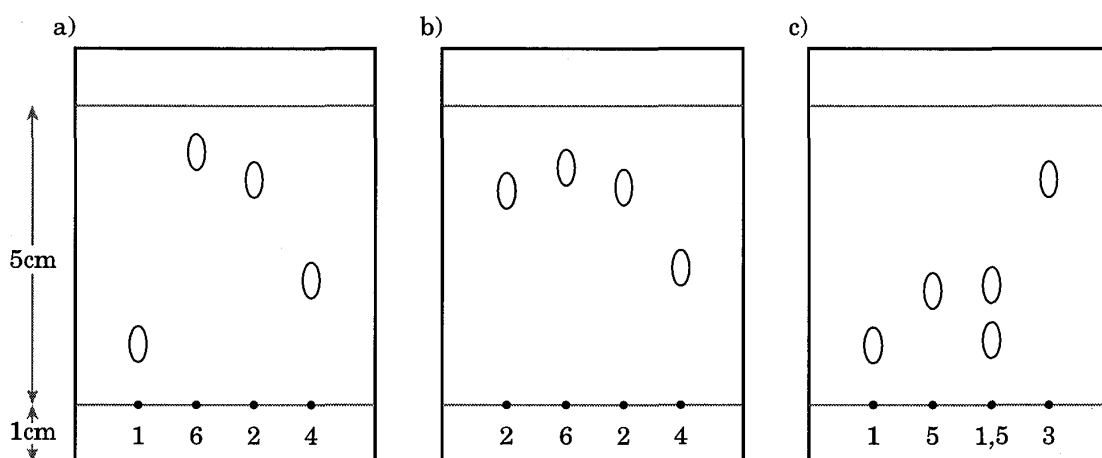


Fig. 3-2. Chromatogram of prine, pyrimidines and nucleosides on cellulose DAEA plate. Solvent, water. Samples, (1) adenine, (2) uracil, (3) thymine, (4) cytosine, (5) adenosine, (6) uridine

a) はアデニン、ウリジン、ウラシル、シトシン、b) は、ウラシル、ウリジン、ウラシル、シトシン、c) はアデニン、アデノシン、アデニンとアデノシンの混合液、チミンである。同じ条件で展開したこの三つのプレートの  $R_f$  値は再現性もよく、また、アデニン、アデノシンの混合液もそれぞれ単独で展開した場合の  $R_f$  値とよく一致し、よく分離されていることがわかる。ただし、チミン、ウラシルについては、ほとんど同じ  $R_f$  値でありこの条件では分離することが不可能であった。

展開には、イソプロピルアルコール-塩酸系、*n*-ブチルアルコール酢酸-アンモニア-水系などを用いて試行実験を行ったが、このセルロースの薄層を用いる場合、展開溶媒としては水が適しているようである。また、薄層プレートはセルロース DEAE のほか、セルロース ECTEOLA についても試したが、分離が良好でないため、この実験ではセルロース DEAE を用いることにした。

#### 4. 金属イオンの分離分析

TLC による無機イオンの分析は 1960 年に Seiler が報告して以来、多くの研究が報告されている<sup>1a, 4)</sup>。薄層としては、セルロース、アルミナなども利用されるが、主としてシリカゲルが用いられる。ここでは、銅、鉄、コバルトなどの金属イオンをプラスチックの指

示板にシリカゲルを固定相としたシリカゲルの薄層プレートを用い分離分析を試みる。

### 器具・試料

- (1) 試料：硝酸銅，硝酸コバルト，硝酸鉄 1 mg/ml の水溶液
- (2) 薄層プレート：薄層クロマトグラフィー用スポットフィルム S196（東京化成）
- (3) 器具：500 ml トールビーカー，ガラスキャピラリー，アルミホイル，メスシリンダー
- (4) 展開剤：アセトン (25 ml)，ベンゼン (15 ml)，アセトニルアセトン (10 ml)  
0.1 mol/l 塩酸 (5 ml)
- (5) 発色試薬：ピリジルアゾナフトール (PAN) 0.1% メタノール溶液

### 実験操作

- (1) ピリジルアゾナフトール (PAN) 0.1% メタノール溶液を薄層プレートに噴霧し，乾燥器中 105℃ で約 1 時間乾燥し活性化する。
- (2) 500 ml のトールビーカーに展開剤を入れる
- (3) プレートの下端より 1.5 cm (原線) と 9.5 cm のところに鉛筆で薄く線を引く。
- (4) ガラスキャピラリーを用い，原線上に 1 cm 置きに試料溶液を塗布する。  
試料溶液は直径 2 mm くらいの円形スポットになるようにする。
- (5) 2～3 分風乾後，トールビーカーの中にたてかけ，ビーカーの上端をアルミホイルで

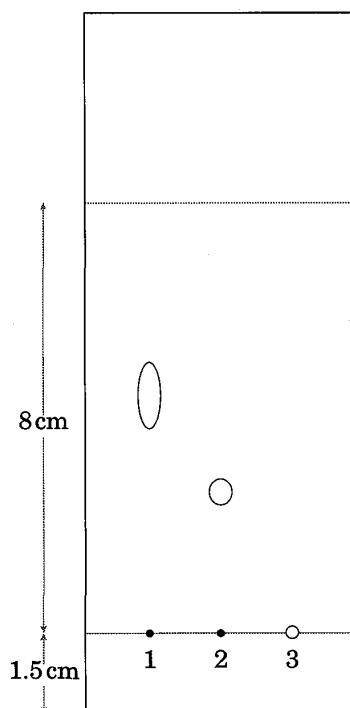


Fig. 4-1. Chromatogram of metal ions on silica gel plate. Solvent system, acetone-benzene-acetonylacetone-0.1 mol/l hydrochloric acid. Spraying reagent 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol (PAN)-0.1% methanol. Samples, (1) copper nitrate, (2) cobalt nitrate, (3) iron nitrate.

しっかりと覆う。

- (6) 試料の塗布されている原線まで展開剤が上昇したら展開開始とする。
- (7) 展開剤が上部の線に到達したら、直ちにプレートを展開剤から取り出す。
- (8) 原点から各スポットの中心までの距離をはかり、各試料の  $R_f$  値を求める。

## 結果と解説

Fig. 4-1 は、シリカゲル薄層にピリジルアゾナフトール (PNA) を噴霧したプレートを用いて分離したコバルトイオン、銅イオン、鉄イオンのクロマトグラムである。銅イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ ) の  $R_f$  値は 0.6, コバルトイオン ( $\text{Co}^{2+}$ ) は 0.39, 鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) はほとんど移動せず 0 である。三つの金属イオンは PNA を噴霧したプレート上でよく分離されたことがわかる。展開時間は 30 分である。展開溶媒は文献 4 より展開時間が 30 分以内で、しかも分離能がよい組み合わせ (アセトン, ベンゼン, アセトニルアセトン, 0.1 N 塩酸) を選んだ。薄層クロマトグラフィーでは、展開後、種々の検出試薬を噴霧して着色させ、着色の程度によって確認するのが従来の方法であるが、あらかじめ金属キレート化剤 PAN を噴霧しておく方法<sup>4)</sup>で行ったので展開中分離過程を見ることができる。この発色は金属イオンと PAN とのキレートによる呈色を分離に応用している。多くの重金属イオンの PAN キレートは赤紫に呈色するが、コバルトイオンは青紫に呈色するので区別しやすい。

## II. ゲル浸透クロマトグラフィー GPC (gel permeation chromatography)

GPC による分離は、固定相に多孔性のスチレンゲルを用い、これをステンレスカラムに充填し、溶媒をゲルの細孔に保持させた状態で分離を行う。分離の機構は次のように考えられる<sup>1d~f)</sup>。試料をカラムに注入し、溶媒 (移動相) で展開させる際に、溶質分子は充填剤の細孔に保持されている溶媒に浸透するが、その度合は分子サイズによって異なる。すなわち、分子サイズが大きく、細孔に入り込めないものほど浸透の度合いが小さい。したがって分子サイズの大きいものから順次、カラムの外に流出し分離されることになる。カラムからの溶出溶液中の試料濃度を自動記録することにより、濃度を縦軸に、溶出量を横軸とした GPC 溶出曲線 (クロマトグラム) が得られる。

カラムの全容積を  $V_t$ , ゲル基質の容積を  $V_g$ , ゲル粒子外部容積 (void volume) を  $V_0$ , ゲル内部容積 (inner volume) —ゲル内部に含まれている溶媒の容積—を  $V_i$  とすると

$$V_t = V_0 + V_i + V_g \quad (1)$$

であり、GPC における移動相と固定相の容積はそれぞれ  $V_0$  と  $V_i$  に相当する。試料がカラムに注入されてから流出されるまでに要した溶媒の量、すなわち溶出量を  $V_e$  で表すと、 $V_e$  は次のように定義される。

$$V_e = V_0 + KV_i \quad (2)$$

ここで、 $K$  は分配係数で 0~1 の値をとり、 $K=0$  は分子サイズが大きくゲル内部に全く入りえない溶質分子、 $K=1$  は溶質がゲル内部全体に浸透していくことができる小さい分子であることを示す。GPC では溶質とゲルとの相互作用がない限り、溶質の  $V_e$  値は  $V_0$

と  $V_0 + V_i$  の間になるわけで、 $V_0$  が小さく  $V_i$  が大きいゲルほど分離性能がよいことになる。測定において、溶出量  $V_e$  はクロマトグラムのピークの位置から求めるが、この  $V_e$  値は厳密には (2) で表される容積のほか、試料注入口からカラム入口までと、カラム出口から検出器までの dead volume を加えたものになる。

分離効率については、カラムの分離能をあらわす理論段数と分離度の二つのパラメータで測ることができる。理論段数  $N$  は溶出量を  $V_e$ 、そのクロマトグラムのベースラインにおける幅を  $W$  とすると次式

$$N = 16(V_e/W)^2 \quad (3)$$

で定義され、 $N$  が大きいほどカラムの分離能が良いことを示す。また、分離度  $R$  は、次式で表される。

$$R = 2\{(V_{e,1} - V_{e,2})/(W_1 + W_2)\} \quad (4)$$

添字 1 と 2 は、それぞれ試料 1 および 2 の  $V_e$ 、 $W$  であることを示す。溶出曲線の二つのピークが分離されるためには  $R > 1$  である。

### 1. アルキルアルコールの分離分析

ゲル浸透クロマトグラフィー GPC により、炭素数が 1~5 の直鎖アルキルアルコール、および炭素数 4 のブチルアルコールの異性体 4 種について、溶媒にトルエンを用いて分離分析を試みる。

#### 器具・試薬

- (1) 試料：炭素数が 1~5 の直鎖アルキルアルコール 5 種、および炭素数 4 のブチルアルコールの異性体 4 種である。試料は Table 5-1 にまとめて示した。試料濃度：約 0.1 ml/ml のトルエン溶液
- (2) GPC 測定装置：Waters 社製高速液体クロマトグラフ 244 型、東ソー(株)製カラム TSKgel G1000H<sub>HR</sub> 2 本、試料濃度の検出：示差屈折計、試料溶液注入量：20  $\mu$ l、流速：1 ml/min
- (3) 器具：マイクロシリンジ (25  $\mu$ l)、ホールピペット、ねじ口試験管、ミリポアフィルター、注射筒 (10 ml)
- (4) 溶媒：トルエン

#### 結果と考察

直鎖アルキルアルコールについて、溶媒トルエン、流速 1 ml/min で測定した GPC のクロマトグラムを Fig. 5-1a~e に示す。GPC による分離は分子サイズによっておこなわれ、分子サイズの大きいものから順次カラム外へ流出する。従って、分子サイズが大きいほど溶出量  $V_e$  は小さい。クロマトグラムのピーク位置から求めた直鎖アルキルアルコールの  $V_e$  値は、アルキル基の炭素数が 5 から 1 へと減少するに従って大きい値となり、炭素数の違いによって 5 種類の直鎖アルキルアルコールが明確に分離されることが分かつ

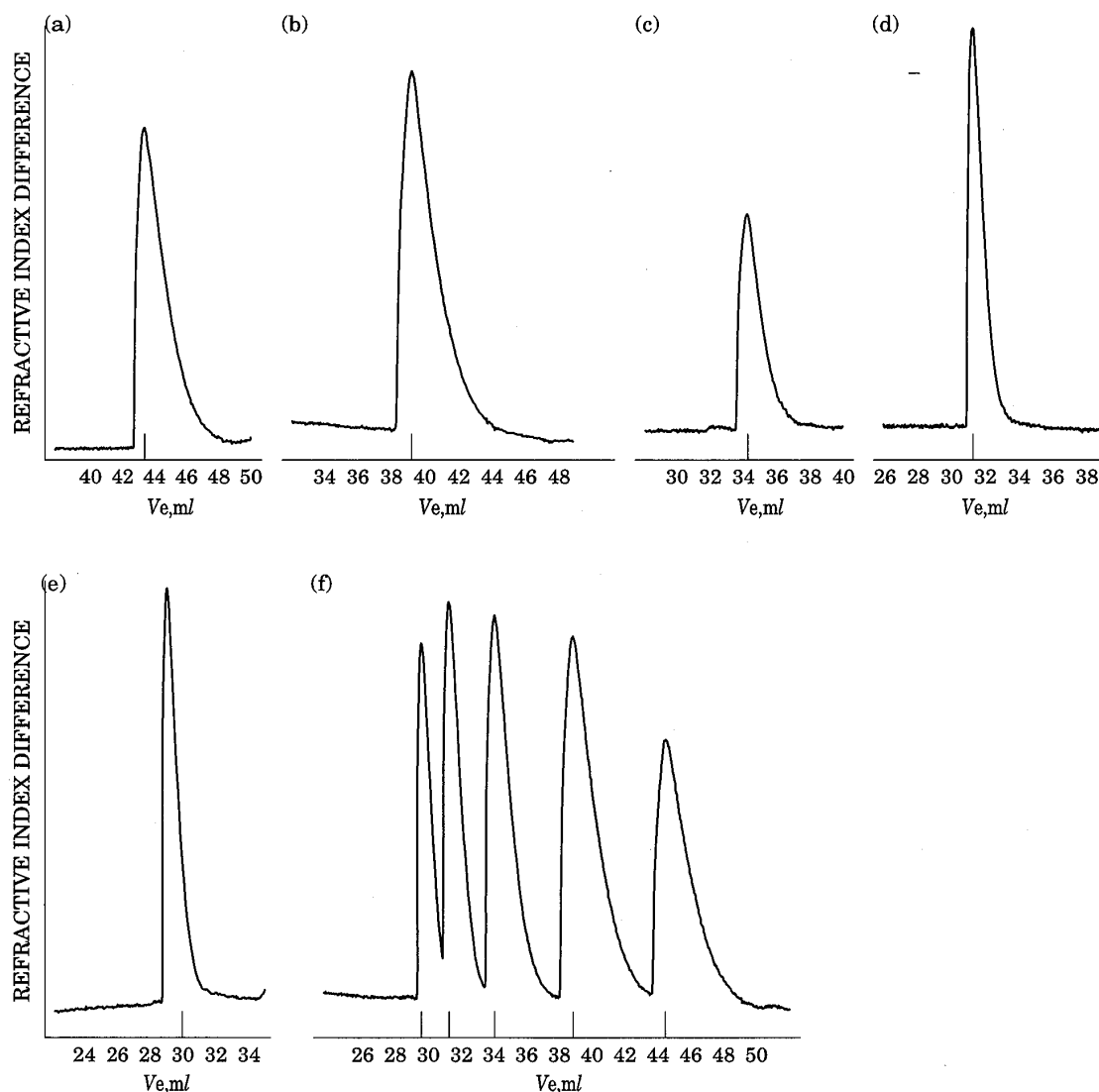


Fig. 5-1. Gel permeation chromatogram for normal alkyl alcohols. Flow rate, 1.0 ml/min. Samples, (a) methyl alcohol, (b) ethyl alcohol, (c) propyl alcohol, (d) butyl alcohol, (e) pentyl alcohol, (f) mixture (a-e)

た。溶出量  $V_e$  値は Table 5-1 にまとめて示した。

Fig. 5-1f は、5 種類の直鎖アルキルアルコールを混合した溶液の GPC クロマトグラムである。クロマトグラムに 5 個のピークが現れ、ピークは互いに十分分離されている。溶出量が最も大きいクロマトグラムのピーク位置は、単一試料の測定で得た最大の  $V_e$  値 43.8 ml と比べ、やや大きい方へシフトして現れたが、それ以外の 4 種のアルキルアルコールの  $V_e$  値は、それぞれ単一試料の測定結果と変わらない。ピーク位置より 5 個のピークは左からそれぞれペンチルアルコール、ブチルアルコール、プロピルアルコール、エチルアルコール、メチルアルコールであると判定される。本実験の GPC 測定条件で混合試料の分離は十分可能である。

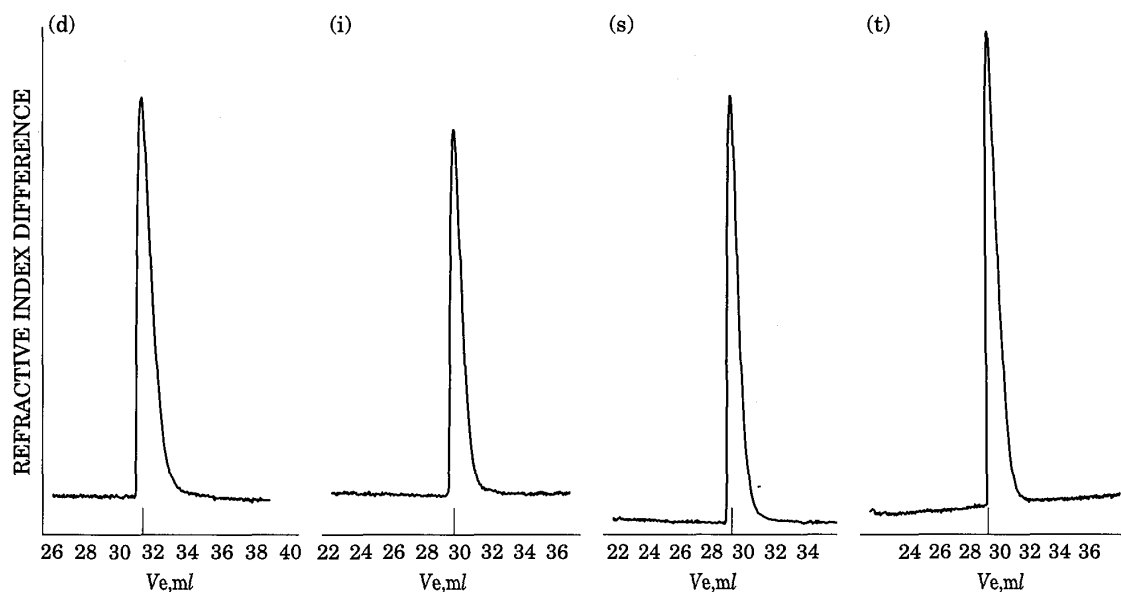
次に、ブチルアルコールの 4 種の異性体についての GPC による分離分析を試みた。ブ

Table 5-1. Elution volume ( $V_e$ ) of normal alkyl alcohols.

Normal alkyl alcohol		$V_e$ (ml)
(a) Methyl alcohol (methanol)	$\text{CH}_3\text{OH}$	43.8
(b) Ethyl alcohol (ethanol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	39.1
(c) Propyl alcohol (1-propanol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	34.2
(d) Butyl alcohol (1-butanol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	31.4
(e) Pentyl alcohol (1-pentanol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	29.4

Table 5-2. Elution volume ( $V_e$ ) of normal butyl alcohol and isomers.

Normal butyl alcohol and isomers			$V_e$ (ml)
Primary alcohol	(d) <i>n</i> -Butyl alcohol (1-butanol)	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	31.4
	(i) Isobutyl alcohol (2-methyl-1-propanol)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_2-\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	29.8
Secondary alcohol	(s) <i>s</i> -Butyl alcohol (2-butanol)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	29.6
Tertiary alcohol	(t) <i>t</i> -Butyl alcohol (2-methyl-2-propanol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	29.6

Fig. 5-2. Gel permeation chromatogram for butyl alcohol and isomers. Flow rate, 1.0 ml/min. Samples, (d) *n*-butyl alcohol, (i) isobutyl alcohol, (s) *s*-butyl alcohol, (t) *t*-butyl alcohol.

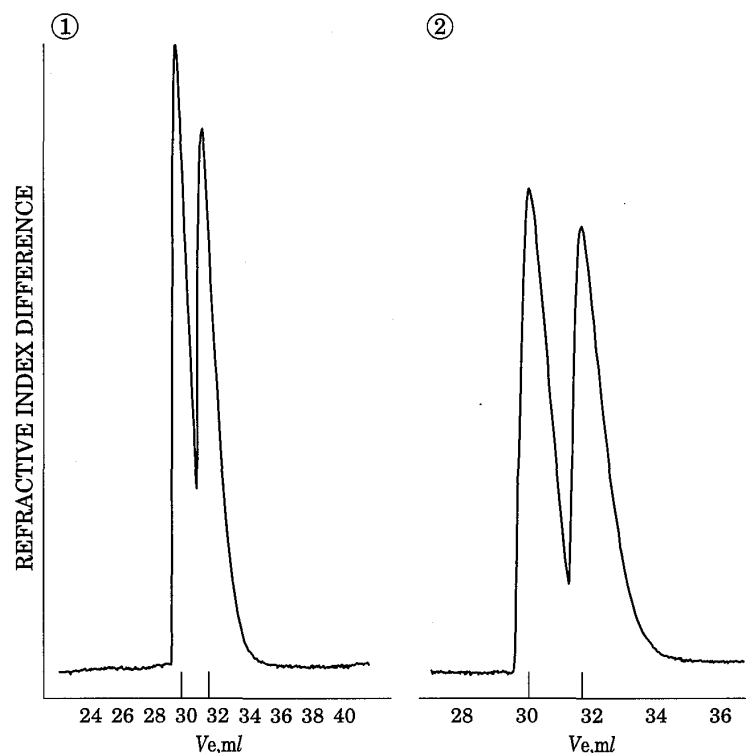


Fig. 5-3. Gel permeation chromatogram for the mixture of *n*-butyl, isobutyl, *s*-butyl and *t*-butyl alcohols. ① Flow rate, 1.0 ml/min, ② Flow rate, 0.5 ml/min.

チルアルコールの異性体は Table 5-2 に示した。

Fig. 5-2 の (d)(i)(s)(t) は 4 種のブチルアルコールについて、溶媒にトルエン、流速 1 ml/min で測定した GPC クロマトグラムである。ピーク位置より求めた溶出量  $V_e$  は Table 5-2 にまとめて示したが、*n*-ブチルアルコール以外の 3 種のブチルアルコールは溶出量が互いに近い値となった。4 種のブチルアルコールの混合試料について測定した GPC クロマトグラムを Fig. 5-3-① に示したが、ピークは四つではなく二つとなった。単一試料で求めた  $V_e$  値から判断して、左のピークはイソブチルアルコール、*s*-ブチルアルコール、*t*-ブチルアルコールが重なりあったもので、右のピークが *n*-ブチルアルコールのピークであるといえる。

前に述べたように、分離効率はカラムの分離能をあらわす理論段数と分離度の二つのパラメータにより決まる。この GPC 測定では、0.1~9 ml の流速で測定が可能であるが、流速をある程度以上に速くすると、カラム内のゲルを圧縮して理論段数を下げることになり、流速を低くするほど理論段数は上がる。また、分離度は流速が小さくなるほど高くなる。そこで分離効率を上げるために、流速を 0.5 ml/min と低くして混合試料の分離を試みたが、3 種類のブチルアルコールの重なり合ったピークを分離することはできなかった (Fig. 5-3-②)。3 種類のブチルアルコールの異性体は、構造式は互いに異なるが、分子サイズは GPC で分離されるほどの違いはないものと思われる。この 3 種のブチルアルコール異性体を分離するには、水への溶解性、沸点などの性質の差に基づく方法が考えられる。



### References

- 1) (a) 薄層クロマトグラフィー—基礎と応用, 石川正幸他, 南山堂(1980), (b) 生化学実験講座 4 糖質の化学, 10 章, 液体クロマトグラフィー, 瀬野信子他, 東京化学同人(1976), (c) 機器分析の手引き, 第2版, 第2集, 4章, 薄層, ペーパー, カラムクロマト法, 井藤一良, 化学同人(1996), (d) 高速液体クロマトグラフィー, J. J. カークランド編, 原田義正, 鴈野重威監訳, 講談社サイエンティフィク(1975), (e) 液体クロマトグラフィーの最適化, F. ガイス著, 原田昭二, 大森竹塩, 成松一久訳, 講談社サイエンティフィク(1980), (f) 高速液体クロマトグラフ分析, 日本分析化学会関東支部編産業図書(1982).
- 2) S. A. Hansen, *J. Chromatogr.*, **107**, 224 (1975).
- 3) E. Stahl & U. Kaltenbach, *J. Chromatogr.*, **5**, 351 (1961).
- 4) 渡辺兵蔵, 化学教育, **22**(5), 347-350 (1979).

## An Introduction to Practical Chemistry

### II. Experimental Study of Chromatographic Analysis

Mari SATO and Noriko YAMAGUCHI

#### Synopsis

Chromatography is an effective method to separate mixtures into their components, which resemble very closely in chemical properties. The method permits observation of separation process of the components, which is an advantage for the laboratory experiment.

Thin layer chromatography and gel permeation chromatography have been applied the separation and detection of the substances as follows,

- I. Analysis by thin-layer chromatography(TLC).
  1. Mono- and disaccharides.
  2. Amino acids.
  3. Prine, pyrimidines and nucleosides.
  4. Metal ions.
- II. Analysis by gel permeation chromatography (GPC).
  1. Alkyl alcohols.