

13章 薄層クロマトグラフィー

齊藤 烈*1・鈴木 喜隆*2
丹羽 治樹*3

13.1 はじめに

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、有機化合物の分析のためのもっとも簡便な方法として日常的に使用され、これまでにいくつかの成書や実験書が出版されているが、この分野の技術の進歩は目覚しく、つぎつぎに新製品が開発されている。したがって、以前の実験書はあまり役に立たないのが実状であり、各メーカーの最新の製品に関する情報をカタログなどを通して常に調べておく必要がある。多種類の TLC プレートが比較的安価に市販されているので、現在では、特殊な場合を除いて自家製の TLC を作る必要はなくなっている。

13.2 TLCの種類

分離の目的に応じて以下の三種(13.2.1 ~ 13.2.3)に大別される。

13.2.1 薄層クロマトグラフィー (TLC: thin layer chromatography)

通常のもっとも一般的なもので、分析の目的に使用される。ガラス板にコーティングした TLC プレート、アルミ箔に塗付した TLC アルミシートやプラスチックシートなどがある。吸着剤として、シリカゲル、アルミナ、セルロース、けいそう土、ポリアミドおよび化学修飾型シリカゲル(逆相タイプ)などがある。固着相に検出のための蛍光指示薬(不溶性無機化合物)を含有するものももっともよく使用され、 $F_{\text{波長}}$ の記号で明示されている。吸着剤(シリカゲル、アルミナ)の粒子サイズも明示されている。

〈例〉 Merck TLC プレート Silica gel 60 F₂₅₄: ガラス板に粒子平均直径 60 Å

*1 SAITO Isao 京都大学教授(大学院工学研究科合成・生物化学専攻) 工博

*2 SUZUKI Nobutaka 国立水産大学校教授(食品化学科) 農博

*3 NIWA Haruki 電気通信大学教授(電気通信学部) 理博

のシリカゲルをコーティングしたもので、254 nm で励起すると緑色の蛍光を発するマンガン活性化ケイ酸亜鉛を蛍光指示薬として含有するもの。

13.2.2 分取薄層クロマトグラフィー (PTLC: preparative thin layer chromatography)

大量の試料を分取するのに使用する。層の厚さ 1.5 ~ 2 mm のシリカゲルなどの吸着剤を塗付したもので、シリカゲル、アルミナ、セルロース、逆相タイプなどが各種ある。濃縮ゾーン付きの PTLC が便利である。

13.2.3 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC: high performance thin layer chromatography)

通常の TLC より粒子がきわめて小さいシリカゲル (5 ~ 10 μm) を担体として 1/20 量以下が最適サンプル塗付量であるため、スポットの広がり小さく、検出感度が高い。したがって、デンストメーターなどを用いる定量分析には最適である。シリカゲル、アルミナ、セルロースなどのほかにも、各種の化学修飾シリカゲル (逆相タイプ) が市販されている。価格が高いのが難点である。

13.2.4 化学修飾シリカゲル TLC の種類と選び方

シリカゲル表面に有機部位 (R) を結合させることにより、選択的クロマトグラフィー特性を与えたものである。



これによりシリカゲル表面の水酸基の影響を減少させ、従来のものとは異なる分離が可能となる。R の極性により、(i) 親油性基 (アルキル基), (ii) 極性な基 (アミノプロピル, シアノプロピル, シアノブチル基など), (iii) イオン交換基 (スルホン酸, カルボン酸, 第四級アミン) など各種の化学修飾型 TLC, HPTLC が市販されている。吸着-分配クロマトグラフィーでは一般に固定相となる充填剤のほうに移動相となる溶離液より極性が大きく、この系を順相系というが、その逆は逆相系 (RP: reverse phase) と呼ばれる。

化学修飾型 TLC および HPTLC は各社から多くの種類が発売されている。Merck 社製のもの为例にとり、その種類と選び方を表 13.1 に示す。

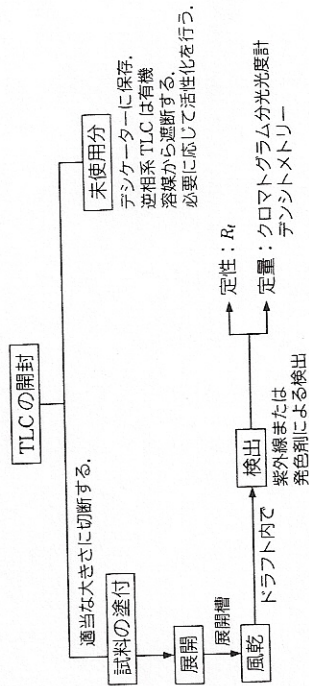
親油性の大きさは R の炭素数, RP-2 < RP-8 < RP-18 の順に大きくなる。一般的には、試料がアルコールなどに溶けやすいときには RP-2, クロロホルムやセトロンに溶けやすい場合には RP-8, ヘキサンなどの無極性溶媒にしか溶けないときには RP-18 を選ぶ。価格は高いけれども HPTLC を選択したほうが得な場合が多い。

表 13.1 化学修飾型クロマトグラフィーの種類

Table with 4 columns: Type, Abbreviation, Functional Group (R), Characteristics. Rows include RP-2 (ジメチルシリル), RP-8 (n-オクチルジメチルシリル), RP-18 (n-オクタデシルジメチルシリル), NH2 (プロピルアミノ), and CN (γ-シアノプロピル).

13.3 TLC の実際

基本操作および注意事項を以下のフローチャートに示す。



13.3.1 試料の塗付

通常の TLC では 1 ~ 5 μl が適量であるが、HPTLC ではこの約 1/20 が適量で、できるだけ小さくスポットする。逆相系ではメタノール-水など含水溶媒に試料を溶かす。手製または市販のキャピラリーを用いるが、定量用にはマイクロシリンジとマイクロメーターを組み合わせたアプリーケーター (ナノプリーケーター) を用いたほうがよい。

13.3.2 展開

展開溶媒の選択は TLC ではもっとも重要であるが、溶媒の極性、沸点、粘度、

表 13.2 TLC 用展開溶媒の物性

この表は溶媒の諸性質を標準シリカゲルを用いたときの溶出力の強さの順に従って配列したもので、一つの目安として利用できる。
H. Halpaap, "Einführung in die HPDC," ed. by R. E. Kaiser, Verlag/Bad, Dürkheim (1976).

	UV	d ₄	bp	Evap. no.	η	Dc	Dm	E _T
ヘ	ン	195	0.684	98.4	0.40			
ヘ	ン	195	0.659	68.8	1.4	0.31	1.9	30.9
ベ	ン	200	0.626	36.1	0.22			
シ	ン	210	0.779	80.8	3.5	0.94	2.0	0
二	炭	380	1.263	46.3	1.8	0.36	2.6	31.2
四	炭	265	1.594	76.8	4	0.94	2.2	32.6
ト	炭	1.462	86.9	3	0.57	3.4	0.89	32.5
キ	ン	290	0.86	140	13.5	0.68		
ト	ン	285	0.872	111	6.1	0.57	2.4	0.38
ベ	ン	285	0.879	80.1	4	0.63	2.3	33.9
レ	ン	245	1.480	61.3	2.5	0.56	4.7	34.5
ジ	ン	230	1.325	39.7	1.8	0.43	8.9	39.1
ジ	ン	0.725	68	1.6	0.35	3.9	1.69	41.1
ト	ン	0.786	82.6	11	2.82	12.2		34.0
レ	ン	0.714	34.6	1	0.24	4.2	1.4	43.9
ジ	ン	0.803	107.7	24	3.71	18.2	3.12	34.6
ア	ン	0.782	82		0.39	37.5		46.0
メ	ン	0.801	115.9	10	0.59			
2-ア	ン	0.785	82.4	10	2.27	18.3		48.6
酢	ン	0.901	77.2	2.9	0.44	6.0		38.1
1-ア	ン	0.804	97.2	16	2.09	20.1	3.1	50.7
メ	ン	0.805	79.6	2.8	0.43	18.5		41.3
ア	ン	0.791	56.2	2.1	0.32	20.7	3.1	42.3
エ	ン	0.791	78.3	8.3	1.14	24.3	3.1	51.9
ジ	ン	215	1.034	101.3	7.3	1.21	2.2	0.4
テ	ン	230	0.887	66	2.3	0.47	7.4	37.4
メ	ン	205	0.792	64.7	6.3	0.52	32.6	55.5
ビ	ン	305	0.982	115.3	12.7	0.92	12.3	40.2
	水		100		0.95	80.2		

UV: UV透過限界(nm), 水を対照として透過率20%のところを限界波長とする(セルの長さ1 cm)
d₄: 密度d₄²⁰, bp: 760 mmHgにおける沸点(°C)
Evap. no.: 蒸発ナンバ, ジエチルエーテル=1.0と比較, η: 22°Cにおける粘度(cp)
Dc: 誘電率(H. Wollmann et al., Pharmazie, 29, 708 (1974))
Dm: 双極子モーメント(Onsagerの式で算出, 上記の文献参照)
E_T: 溶媒極性パラメーター(kcal/mol, 25°C)

試料の溶解度などを加味して適切な溶媒系を見つければ必要がある(表 13.2 参照)。多くの場合、混合溶媒系を用いるが、極性溶媒-無極性溶媒の混合比を変えて R_f 値を調整する。有機溶媒に易溶な無極性試料の分析に多く用いられる展開溶媒としては、ヘキサン-酢酸エチル、ヘキサン-エーテル、ヘキサン-ベンゼンなどがある。低極性試料の展開溶媒としてクロロホルム-メタノール、強極性試料の分離には、順相系 TLC の溶媒としては酢酸エチル-メタノール、ブタノール-酢酸-水(4:1:5)、2-プロパノール-アセトン-水(9:1:2)、フェノール-水(4:1:1)などを用いる。

逆相系の場合には、メタノール、アセトニトリル、ジオキサンなどと水の混合溶媒を用いるが、混合比は、まずこれらの有機溶媒のみで展開し、R_f 値が大きいたまには水の混合比を上げて R_f 値を下げる。イオンペーパーを用いることにより試料のカウンターイオンとイオンペーパーをつくるような溶媒系を用いると高度の分離が達成されることが多い。酸性物質の分離にはカウンターイオンとして第四級アンモニウム塩やトリエチルアミンの添加、塩基性物質の分離にはアルキルスルホン酸塩を含む緩衝液や酢酸、ギ酸の添加が良好な結果を与えることが多い。

13.3.3 検出方法

(1) 紫外線による直接検出

プレートから溶媒を十分揮発させ、紫外光(254 nm または 366 nm)を照射することにより検出する。蛍光指示薬入りの TLC を用いると緑色の蛍光を発生するが、試料に UV 吸収があると蛍光が消光され黒青色のスポットが検出される。

(2) 発色試薬による検出

試料が約 230 nm 以上に紫外吸収をもたないときには、各種の発色試薬を噴霧するかまたは発色試薬を含む溶液に浸漬してクロマトグラム上で発色させる。in situ の誘導体化により可視部または紫外部に吸収をもつ物質や蛍光物質に変えて検出する方法もある。表 13.3 に代表的な発色試薬を示す。

表 13.3 の発色試薬以外に、特定の官能基と反応する多数の有機発色試薬がある。たとえば、ニンヒドリン(アミノ酸)、プロモクレゾールグリーン(カルボン酸)などである。Merck 社の "Dyeing Reagents in Thin Layer and Paper Chromatography" には 355 種類の噴霧試薬の調製法が記されている。

13.3.4 定性および定量

定性分析の場合には、同一プレートで展開した比較物質の R_f 値や発色剤の色調で同定する。分取してから各種スペクトルにより同定しておけばより安全である。

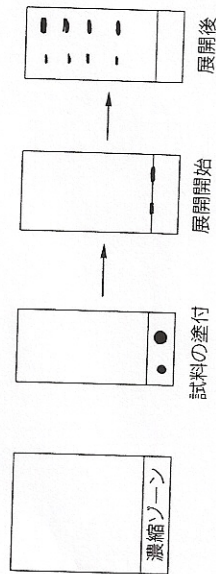
表 13.3 有機化合物のおもな発色試薬

試 薬	つくり方	使用 法	対象化合物
リンモリブデン酸	5~10%のリンモリブデン酸のエタノール溶液	噴霧または浸漬後ホットプレートで120℃に加熱	多くの還元性有機化合物、脂質、ステロイドなど(長鎖カルボン酸、尿素など発色しないものも多い)
ヨウ素	固形ヨウ素またはメタノール溶液	密栓瓶に入れ蒸気で発色	かなりの多くの有機化合物(放置すると退色する)
塩化マンガン	0.2 g MnCl ₂ · 2H ₂ O を水 30 ml に溶かしメタノール 30 ml と濃硫酸 2 ml を添加	噴霧後 10 分間、120℃ で加熱し UV (366 nm) で検出	脂質、ステロイド類など
p-アニスアルデヒド	p-アニスアルデヒド (9.3 ml) と酢酸 (3.8 ml) をエタノール (340 ml) に溶かし濃硫酸 (12.5 ml) を添加	噴霧後 100℃ に加熱	多くの有機化合物、ただし発色しないものも多い

定量分析は TLC スポットの分光光度測定により行う。この際には HPTLC を用いたほうがよい。HPTLC の定量では ng ~ pg オーダーの試料の定量が可能である。微小光束によりスポットを細分化し、ジグザグスキヤニングして積分値の総和を算出する方法が一般的である。

13.3.5 濃縮ゾーン付き薄層クロマトグラフィー

点状、円状または帯状に塗付した試料が濃縮ゾーンとの境界面で線状となり、展開後には帯状に検出される。濃縮ゾーンには吸着性のないポララスシリカが使われている。試料の塗付量が多い場合や希薄溶液を分離するのに最適である。TLC, PTLC, HPTLC や逆相 TLC, アルミナ TLC など各種の濃縮ゾーン付き TLC が市販されている。

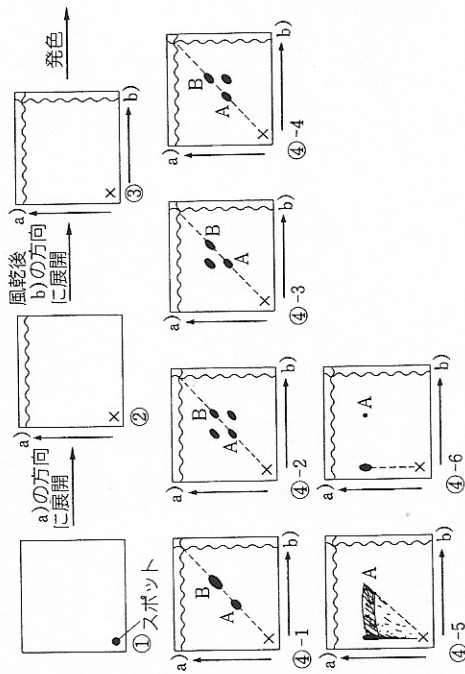


13.3.6 二次元展開法による物質の安定性の確認

同一の展開溶媒で二次元展開すると物質の TLC プレート上での安定性が確

認でき、PTLC やカラムクロマトグラフィーによる分離・精製の適否が簡単に判断できる。

- 市販の TLC プレート(例: Merck TLC プレート Silica gel 60 F₂₅₄, 厚さ 0.25 mm)を適当な大きさの正方形(数 cm 角)に切り出し、試料をコーナーにスポットする。
- 方向を定め 1 回目の展開(a)の方向)を行う。
- TLC プレートを風乾し、適当な時間の後、1 回目の展開と同一の展開溶媒を用いて a) の方向とは直角の b) の方向に展開する。
- 適当な方法で発色させる。



- ④-1: A, B が対角線上に並ぶ: A, B ともに安定
- ④-2: A, B は互いに変換する。
- ④-3: B → A に変化する。
- ④-4: A → B に変化する。
- ④-5: A は展開中に分解する。
- ④-6: A は 1 回展開後の風乾中に原点物質に変化(空酸化など)する。

13.4 各 論

13.4.1 TLC による過酸化物の検出および分離

過酸化物の検出ならびに確認は、化学実験を安全に行ううえできわめて重要である。反応混合物中に過酸化物が残存しているかどうかを調べるのに TLC

は有用である。一方、不安定な過酸化物を単離するのに低温におけるPTLCが用いられる。あらかじめ展開溶媒と展開槽を冷却しておき、低温の試料溶液を素早くPTLCに塗付する。低温下(冷凍庫中でもよい)で展開し、過酸化物のバンドを溶出する。これらの操作は冷凍室で行えばより安全である。展開溶媒として低沸点のペンタン系の混合溶媒を用いるとよい結果が得られる場合が多い。

【過酸化物の検出試薬】

TLC上で過酸化物を検出するために次の試薬が用いられる。

NH_4SCN (0.63 g) および濃硫酸 (0.125 ml) を水 (7 ml) に溶解する。一方、 $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.88 g) を水 (7 ml) に溶かす。双方の試薬を TLC に噴霧すると過酸化物は赤褐色のスポットを与える。

13.4.2 TLCによるDNSアミノ酸光学異性体の分離

プロリンを除くすべてのダンシル(dansyl, DNS)アミノ酸の光学異性体が逆相TLCにより分離される*。まず市販の逆相TLCプレートを緩衝液A [酢酸ナトリウム0.3Mを含むアセトニトリル-水(6:4)溶液]で試料を塗付せずそのまま展開する。風乾後、このTLCプレートをN,N-ジ-n-プロピル-L-アラニン(8mM)および酢酸銅(II)(Cu(OAc)₂, 4mM)を含むアセトニトリル-水(97.5:2.5)に浸すかまたはスプレーで噴霧し再び風乾する。つぎにDNSアミノ酸の水溶液をTLCプレートを塗付し緩衝液Aで展開するとD, L体がTLC上で明確に分離する。

アミノ酸の種類により適宜展開溶媒のアセトニトリル-水の混合比を変える。

13.4.3 硝酸銀でコーティングしたTLCプレートの調製と炭化水素の分離

不飽和結合をもつ炭化水素(アルケン類, アルケン類)は銀イオンとπ錯体を形成する。このことを利用して、硝酸銀でコーティングしたTLCプレートによりアルケン類, アルケン類, アルカン類を相互に分離することができる。

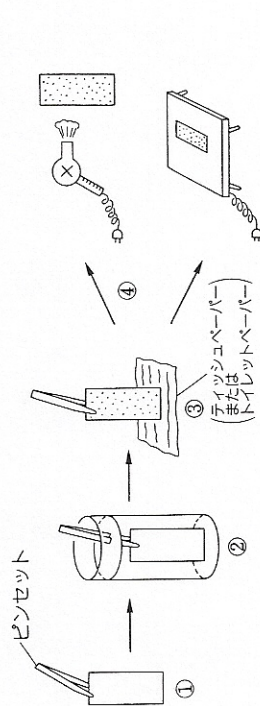
(1) 硝酸銀でコーティングしたTLCプレートの調製法

① 市販のTLCプレート(例: Merck TLCプレート Silica gel 60 F₂₅₄, 厚さ0.25 mm)を適当な大きさに切り出す(5 cm × 1 ~ 1.5 cm位)。

② 硝酸銀の5 ~ 20%アセトニトリル溶液に浸す。

③ 硝酸銀のアセトニトリル溶液からプレートを取り出し、斜めに立ててシリカゲルの表面が半乾きになるまで風乾する。

④ ドライヤーあるいはホットプレート上で乾燥させる(以後はプレートを直接手で触れないように、硝酸銀で火傷する)。調製したプレートは暗箱に保管する。



(2) 使用方法

試料のスポット, 展開などは通常のTLCの場合と同様に行う。R_f値はアルカン類>アルケン類>アルキン類の順に小さくなる。また不飽和結合の多いものほどR_f値が小さくなる。アルケン類のシーストランス異性体の分離にも利用できる。

硝酸銀コーティングと同様にして, リンモリブデン酸でTLCプレートをコーティングできる。コーティングには10%程度のエタノール溶液を用いる。使用目的・方法は硝酸銀コーティングプレートと同じであるが, 炭化水素類に限らず, 通常のTLCでは分離の悪い場合に, 良い結果が得られることがある。また, この場合は展開したTLCプレートを加熱するだけで発色させることができる。

13.4.4 分取薄層クロマトグラフィ: 硝酸銀でコーティングした分取用

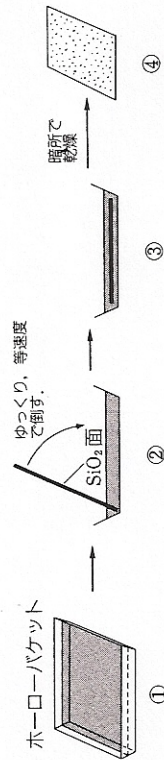
プレートの調製法

① ホーロー製バケツに硝酸銀のアセトニトリル溶液(5 ~ 20%溶液)を入れる。

② 市販のTLCプレートの一端をバケツの底につける。

③ シリカゲルの面を下に向け, 同じ速度でゆっくりとプレートを倒しながら溶液に浸していく。

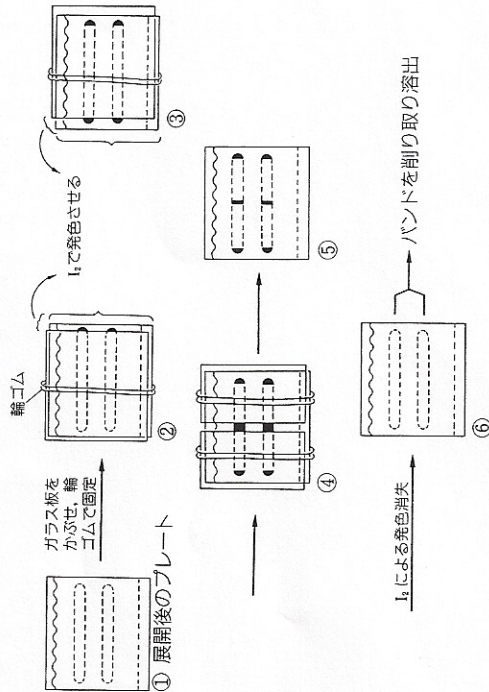
④ バケツからプレートを取り出し, 暗所で風乾(温風乾燥)する。



* S. Weinstein, *Tetrahedron Lett.*, 25, 985 (1984).

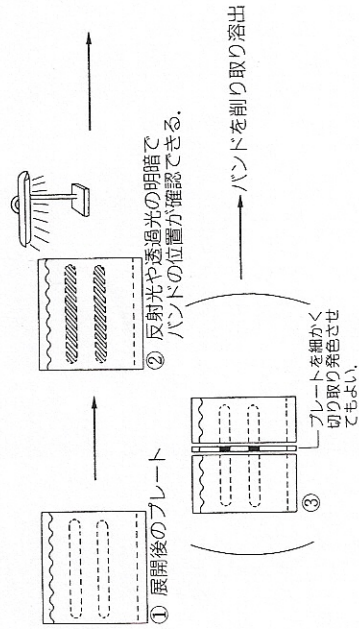
13.4.5 分取薄層クロマトグラフィ：UV照射でバンドを検出できない場合のバンドの確認法

- (1) I₂による発色
- ① 展開し、溶媒を除去する。
- ② TLCプレートに同じ大きさのガラス板をかぶせ、バンドの右端を5mm程度露出させる。露出部分に0.5% I₂-クロロホルム溶液を噴霧するか、I₂蒸気飽和容器(I₂の結晶を入れた密閉容器)に入れ発色させる。
- ③ 同様にしてバンドの左端を発色させる。
- ④ 2枚のガラス板で中央部を幅5mm程度露出させてI₂発色させる。
- ⑤ 両端、中央の発色部分を目安にしてバンドの位置を決める。
- ⑥ I₂による着色が消失(ドライヤーで温風を吹きつけると早い)したら、バンドをカミソリの刃などで削り取り溶出する。



(2) 透過光によるバンドの確認

- ① 市販の0.25 mmのTLCプレートで分取TLCを行う。
- ② 展開溶媒を除去した後、蛍光灯などで光をあてて透かして見ると(光をシリカゲルの斜め上からあてて反射させてもよい)、分離したバンドが確認できる。
- ③ バンドが確認できない場合はTLCプレートをガラス切りで細く(～5 mm幅)切り出し、適当な発色剤で発色させることもできる(表13.3参照)。



20 cm × 20 cm, 0.25 cm厚さのプレート1枚で～10 mgの分離が可能である。

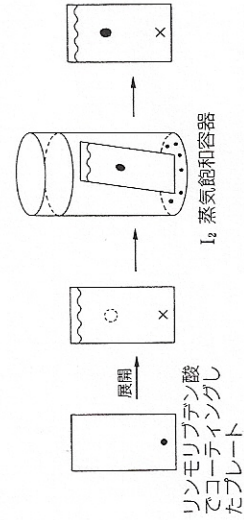
(3) 水を噴霧する。

展開したプレートを風乾後、水を噴霧すると、

- ① 親水性物質のバンド：透明
 - ② 疎水性物質のバンド：不透明
 - ③ シリカゲルのみの所：半透明
- となりバンドの位置が確認できる。

13.4.6 発色法：揮発性のものの発色

TLCで一番困難なことは揮発性物質の発色である。UV照射、I₂発色なども検出しにくい場合、リンモリブデン酸でコーティングしたTLCプレート(調製法：13.4.3参照。数%～10%のリンモリブデン酸を含んだ95%エタノール溶液でコーティングする)を用いて展開した後、プレートをI₂蒸気飽和容器中に放置すると明瞭にスポットを検出できることがある。低分子のアルケン類やアルキン類に有効である。



13.4.7 発色法：発色剤を噴霧させないで発色

- ① 展開後の TLC プレート を乾燥させる。
- ② 発色剤の溶液に TLC プレートを浸漬する(1~2秒)。
- ③ シリカゲルの表面が半乾きになるぐらいまで風乾する。
- ④ ホットプレート上で加熱発色。

利点：噴霧しないので周囲が汚染されない。発色剤の消費が少ない。発色が鮮明。

13.4.8 分取用アビセル TLC の調製

ペーパークロマトグラフィー(PC)は R_f 値の再現性には優れているが、スポットがひろがりやすく、またごく少量の試料しかのせることができない。一方、セルロース粉末 TLC は分離能やスポットがひろがらない点では優れているが、 R_f 値の再現性および試料量の点で十分でない。単純にセルロース粉末 TLC の厚さを増してやると、TLC 上にひび割れができてしまう。この点を改良して、セルロース粉末厚層 TLC を調製する方法を以下に述べる。本法によれば、厚さ 1 mm の TLC を得ることができる。 R_f 値の再現性はかなり良好である。

【操作法】

アビセル(微結晶性セルロース：Merck 社またはフナコシ社) 30 g とハイフロ・スーパーセル(半井化学；セライト；15 gals/sq · ft/h) 10 g (使用前に水洗いし、110 °C で 12 時間乾燥) を乳鉢中で水 140 ml とよく練り合わせ、TLC 用アプリケーション(矢沢科学)を用い厚さ 1.0 mm に、20 cm × 20 cm のガラス板 3 枚に塗布する(塗布法は普通の TLC の作り方と同じ)。できた TLC をひび割れを防ぐ目的で木製の引き出し様の箱中に入れ、ゆっくりと 2 日かけて乾燥させる(20 ~ 25 °C)。または、1 夜上記箱中に放置した後、TLC 用の熱風乾燥器で 60 °C で 1 時間乾燥してもよい。

このようにして調製したアビセル厚層 TLC の R_f 値は、通常の分析用プレパラート・アビセル TLC 厚さ(0.25 mm)：たとえば「機器分析のてびき 2(増補改訂版)」、化学同人、p. 45~57 参照)の R_f 値とほぼ一致し、試料の量は 20 cm × 20 cm 1 枚あたり 20 ~ 30 mg、良好なときは 100 mg でも展開できる。

展開溶媒は PC に使えるものならよい。検出には UV ランプ(366 nm)を、溶離にはエーテルまたはメタノールを用いる。