薄層クロマトグラフィー

Thin-layer chromatography (TLC)

逆相 TLC

片山佳樹^{*1)}

^{*1)} 九州大学 大学院工学研究院
応用化学部門

逆相 TLC は、薄層クロマトグラフィーの担体に、疎水修飾したシリカゲルを用いた薄層クロマトグラフィーのことである。オクタデシル基を修飾したシリカゲルを用いることが一般的であるが、オクチル基、ジメチルシリル基などを修飾したシリカゲルを用いる場合もある。極性の高い化合物や、糖、アミノ酸、ペプチドなどの分析に、簡便で特別な装置も必要がないため、おおよその純度を見極めるにはよい方法といえる。

逆相 TLC は、通常の順相 TLC と基本的には同様に考えることができるが、固定相が疎水性であり、移動相には水を含むメタノールやアセトニトリルなどの極性溶媒を用いる。順相 TLC に比べ、溶媒の展開がゆっくりで、水の含量が上がるほど展開速度が急激に小さくなるのと、固定相が濡れにくくなるので、可能であれば水の含量が30%以下で行う方が現実的である。溶媒の展開に伴うスポットの移動は、順相 TLC の場合と同様、Rf 値(スポットした成分の原点からの移動距離／溶媒先端までの距離)で評価する。水の含量が多くなるほど Rf 値は小さくなるが、目的物の展開溶媒への溶解度が非常

に小さい場合や溶媒と固定相双方と分析対象分子の相互作用の強弱によっては、水の含量増加によりある含量まで Rf 値が逆に増加することもあるので注意を要する。

実際に分析する場合には、展開溶媒を入れるための展開槽が必要である。これは、専用のものが市販されているので、それを購入する方がよい。ガラス製で、ステンレス製の蓋がついている。底が W 型に中央部分が隆起した形になっており、展開溶媒の量が節約でき、後述する溶媒蒸気での前飽和の効率も高い、2 層型展開槽が便利である。

展開溶媒を 0.5～1cm ほどの高さまで入れたガラス展開槽の壁面に、展開溶媒で濡らしたろ紙を張り付け、1 時間ほど蓋をして放置し、内部を展開溶媒の蒸気で飽和させるようにする(図 1)。特に、展開溶媒における水の含量が高い場合には、こ

の操作をしておかないと、有機溶媒の展開してくる先端と水の展開してくる先端に差ができ(水の先端が下に来る)、分離効率が悪くなったり、再現性が得られなくなったりすることがあるので注意した方がよい。また、水の含量が低い場合でも、プレートの端と中央で溶媒の展開距離に差ができる場合がある。できれば、展開槽を恒温槽に浸けて温度も一定に保つと、結果の再現性の上からもさらによい。

TLC プレートに下から 1cm ほどのところに鉛筆などで線を引き、そこに試料を溶解した溶液(0.1～0.3% 程度)1 μ L ほどをキャピラリーやマイクロピペットなどでスポットする。理想的には、プレートを展開溶媒に浸す前に展開槽内に固定し、展開槽内の飽和に達している溶媒蒸気で、固定相が吸着平衡に達するまで静置してから、展開溶媒に浸す方がよい。その場合、簡単に実施するには、展開溶媒を入れた展開槽に台を置いて、その上にプレートを載せて静置する。ただ、この効果はそれほど顕著ではないので、幅の狭いプレートをを用いる場合などや、明瞭に分離できる試料の場合では、省略してもそれ程大きな影響はないと考えてもよい。

図 1 逆相 TLC の展開のイメージ

分離後の成分の分析は、着色試料でない場合、蛍光色素(マンガン活性化ケイ酸亜鉛、254nm で黄緑色の蛍光)を含ませているプレートを用いると、紫外光をハンディランプで照射することで、蛍光が消光した暗いスポットとして簡単に検出することができる。

もし、展開後も成分間の分離が悪い場合には、2次元TLCによりさらに分離効率を上げることも可能である。プレートの端の方に試料溶液をスポットして、通常のTLC操作を行い、その後、プレートを90度回転させて、展開した部分が下になるようにして、再度、溶媒を展開する。場合によっては、2回目の展開時に溶媒の種類を変えることも可能である。

順相TLCでも同様であるが、分離効率は、たとえ極性が同様であっても、用いる溶媒の種類で変化する。特に逆相TLCでは、水の含量がわずかに変化しただけでRf値が急激に変改する場合があるので注意を要する。また、用いる有機溶媒が、メタノールかアセトニトリルかでも、水の含量と移動度の関係はまったく異なることがあり、溶媒組成の最適化を行うことが重要である。また、スポットする試料がオーバーロードとならないように濃度の最適化も必要である。

Yoshiki Katayama^{*1)}

^{*1)} Department of Chemistry and
Biochemistry, Faculty of Engineering,
Kyushu University

順相 TLC

眞鍋史乃^{*2,3)}

^{*2)} 理化学研究所

^{*3)} 東北大学 大学院薬学研究科

順相のシリカゲルTLCは安価、かつ、簡便に反応追跡や化合物を同定することができる。ちょっとしたコツによりTLCから得られる情報量が増える。

1. スポット前

夏場は空気中の湿気をTLCが吸収してしまい、クロロホルム/メタノール系などの極性溶媒を使用した場合に、うまく展開できないことがある。TLCをシリカゲルを入れた容器に保存、減圧下で乾燥させる、あるいは乾熱オーブンで乾燥させると分離能が上がる。減圧下乾燥させるとTLCが冷たくなるほど、水分を吸収していることがある。

2. スポット時

TLCに溶液をスポットするときにはガラスキャピラリーを使用することが多いが、重要なことはスポットを打つのに使用するキャピラリーの

先端をアンプルカッターで切断して平らにすることである。手で折ったキャピラリーでは、先がギザギザになりうまくスポットできない。

スポットする溶液がDMFやピリジンなどの高沸点高極性の溶媒である場合、スポットがこれらの高極性溶媒により押し上げられて、正常な位置にスポットが出ない場合が多い。スポットした後にTLCそのものを減圧下におき(図2)、溶媒をあらかじめ蒸発させておくとスポットがうまく展開される。

スポットするサンプル溶液の量は少ない(1μL程度)方がよく、かつ、濃度もあまり高くなくて問題ない。むしろ、量が多すぎるとスポットが大きくなりすぎて、複数のスポットが重複してしまい分離が悪くなる。

3. 展開時

必ず、スポットした点の位置よりも展開溶媒の面が下に来るようにすること。

展開溶媒は、極性の低い溶媒A(ヘキサン、トルエン、クロロホルム)をベースとして、極性が比較的高い溶媒B(酢酸エチル、エーテル)を組

図2 TLCスポット上の高沸点溶媒を減圧下除去する手法

み合わせることで決定することが多い。溶媒Aと溶媒Bの比率を変えることで、展開溶媒全体の極性を変えてスポットのRf値を調整する。一方、ある溶媒系で同一のRf値を与える化合物を分離するには、ベースの溶媒Aの種類を変更すると有効である。例えば、ヘキサン／酢酸エチル系で同一のRf値を与える2つの化合物が、トルエン／酢酸エチル系で分離することがある。

展開溶媒を作り置きすると、溶媒の比率が変化して、Rf値が変わったように見えてしまう。長時間(数日程度)の展開溶媒の作り置きは好ましくない。

展開する前に展開槽の中にもろ紙を立て掛けて内部に溶媒蒸気を充満させておくと、分離能が向上する場合がある。例えばクロロホルム／メタノール系では、特にプレパラティブTLCのときには化合物のバンドが曲がりにくくなる。

酸で不安定なものやアミンを分離する場合には、展開溶媒にトリエチルアミンなどを少量添加するとよい。また、1%程度のトリエチルアミンを含むヘキサン溶液に使う前のTLCを浸けたのち、乾熱乾燥させたものを使用することもできる。TLCをアミン溶液に一気に浸すことが均一にシリカゲルの酸性を中和するコツである。

分離が難しい場合、1回展開したTLCを複数回展開する手法が有効

である。一度展開したTLCを乾燥させて、もう一度展開する。この操作を繰り返すことでよりよい分離を得ることができる。この手法では、1回展開したときのRf値を低く抑えておく必要がある。

また、化合物がTLC上で分解しているかどうかを判別する場合や、複数のスポットが重なる場合などは、2次元展開を行う。一度展開したTLCを90度回転させて、再度展開させる。2回とも同じ溶媒を使用し、かつ、化合物がTLC上で分解していない場合には、対角線上のみにスポットが現れる。2回目の展開の場合に1回目の展開と異なる溶媒を使用すると、1回目の展開溶媒で同じRf値をもつスポットが分離できる。

4. スポット検出

スポットの検出には、UV(254nmあるいは366nm)、ヨウ素蒸気、あるいは発色液を使用する。UV検出は展開したTLC上の化合物に影響を及ぼすことがないので、その後、他の検出法を行うことができる。あらかじめヨウ素とシリカゲルを混合した容器の中にTLCを入れると、ヨウ素蒸気による発色が速い。ヨウ素発色は可逆反応なので、ヨウ素発色したTLCをしばらく空气中に置いておくと、ヨウ素が気化して発色がなくなる。そのTLCを用いて、発色液による検出を行うことができ

る。すなわち、1回のTLC展開でUV、ヨウ素、発色液の複数の検出法を試すことができる。それぞれの方法で検出されたスポットに鉛筆でマークしておく、複数の検出によるスポットが一致しているか判別しやすい。

アニスアルデヒド溶液、リンモリブデン酸(+硫酸)溶液が発色液としてよく使用される。なお、発色液の種類はhttps://www.merckmillipore.com/JP/ja/20140529_064426に300種以上記載されているので参照されたい。発色液での検出は、TLCガラス面側から見るとむしろ表からよりもスポットの分離をよく観察できることがある。また、同一Rf値を与える化合物でも発色加熱中に発色の速さ、色の違いから、異なる化合物であることがわかる場合もある。加熱中も目を離さず、観察することが重要である。

標品が入手でき、標品と試料との比較をしたい場合には、同じ位置に両化合物をスポットする重ね打ちを行うと両化合物のRf値が近くても同一化合物であるか否かを判別できる。

Shino Manabe^{*2,3)}

^{*2)} RIKEN

^{*3)} Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University

本連載は、「私たちの研究グループでは、このように行っている」という内容を記述するものであり、記述内容が標準であることを保証するものではありません。