1. 薄層クロマトグラフィーの基礎*

原 昭 二**

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、担体の薄層を“充てん系”とする液相クロマトグラフィーの一形式 (プレート法) である。この方法はすぐれた分離能力をもち、微量の試料の取扱いができるばかりでなく、分析時間がきわめて短い特色をもっている。ここでは TLC の基礎事項の一つとして、移動率の問題について考察してみよう。

1. 薄層クロマトグラフィーの移動率

“移動率 (R_f 値)” は、一般にクロマトグラフ系で測定

される唯一の数値であり、そこから多くの情報を得ることができるが、従来それについて正当な取扱いや評価がなされていないように思われる。すなわち、一方ではクロマトグラフ法を精製のための手技と考え、分離の可否だけを問題にして数量的な表現を無視し、また他方では——特にペーパークロマトグラフィー (PPC) を利用する場合のように、 R_f 値を変動もしない定数と考えて疑うことがなかった。われわれはもう一度出発点に立ち戻り、 R_f 値の正しい意味を理解すべきではないだろうか。

いうまでもなく、クロマトグラフ系 (図 1) は向流系

図 1

と同様に、互いに混り合わない二相から成立ち、その一方のみが移動する (移動相)。試料は両相に分布し、その割合、すなわち 固定相中の濃度 C_s / 移動相中の濃度 C_m を分配または吸着係数 K という。分配系ではその等温線が直線であるが (図 2), 吸着系では二つの試料 A, B のいずれもが非直線性である (K が一定でない)。

ただし C_m が小さい特定の範囲では、これを直線と見なすことができるので、そのような条件、すなわち試料濃度が小さい場合を利用してクロマトグラフ分離を行なう。したがって C_m が大きいとき (試料量が多過ぎるとき)、テーリングを生ずるのは自明の理である。

R_f 値は溶剤の移動速度に対する試料の移動速度の比

図 2

* Principles of thin-layer chromatography

** Shoji Hara 東京薬科大学

(12) 生物物理化学

を表わしたもので、もし充てん系と移動相の流れが均一であることを仮定すれば、それはつぎの式で表わされる。

$$Rf = \frac{1}{1 + K/\rho}$$

ここで ρ は移動相、固定相の断面比を表わす。普通実測される Rf 値 (“見かけの Rf 値”と呼ぶべきである) は、溶剤の先端を 1 として試料の移動距離を表わしたもので、もし流量と流速が一定であれば、両者は同一の値となる。事実、カラムクロマトグラフ法では、一応移動相の流れを均一と見なすこともできる。しかし、プレー

ト法 (PPC, TLC) では、これを均一と見なすことはできないのである。

第一に、TLC の充てん系は “open column” に相当するため、移動相が横向きにも移行し、また表面からの蒸発によって不均一な流れを生じやすい。そのため試料の分布・移動は不規則になる。第二に、いわゆる “dry column” であって、試料の注入は展開溶剤を流す前に行なわれる。そこで移動相の流れ方は充てん系の各所で変動し、展開の初期には移動相の流れが速いので分離の効率が良いが、時間の経過とともに低下してしまう。図 3 a

図 3

図 4

はヘキサンをシリカゲル薄層にしみ込ませた場合（上昇法）の、先端の移動速度 v としみ込む時間 t_p との関係を示したもの（Stahl による）で、しみ込んだ距離 h と t_p との関係は、

$$h^2 = a \cdot t_p$$

となる。図 3b は各種の溶剤について、この関係を測定したもの（Brenner らによる）で、定数 a は溶剤の表面張力などによって異なる値となる。

また溶剤の先端に対するプレート上の各点までの距離を Z/Z_f として、これと ρ との関係を見ると、図 4a（Giddings による）に示すように S 字型となり、移動相の流量は原点付近で大きく、先端では逆に小さくなる。これは R_f 値が変動する値であることを示すものにほかならない。したがって、見かけの R_f 値を測定するとき、 ρ が比較的一定な Z/Z_f : 0.1~0.7 の間の領域に試料を移動させることが必要条件になる。

展開溶剤が混合系の場合、それ自身の先端分析の起ることがあり（極性溶剤を少量含む場合など）、その影響を考慮しなければならない。図 4b は、 $p \sim p'$ の線の上に試料をつけ、一番下の点線を液面としてシリカゲルクロロホルム/メタノール/酢酸（95:5:1）で展開した場合のクロマトグラムである（Brenner らによる）。ここでは溶剤の先端 α のほかに、第二、第三の先端 β, γ を生じている。 $\alpha \sim \beta$ の領域はクロロホルムしかなく、その間のスポットの R_f 値はクロロホルムのみによる展開の場合と同一であり、また γ -フロントより下の部分にのみ 3 成分の展開剤が存在することを示す。各フロントは、同一の試料のスポットを延長することによって見出すことができる。それぞれの領域のスポットの R_f 値は、対応する先端に対して求めるべきであり、その全部を α -フロントに対して算出することは正しくない。

再現性をもった正しい R_f 値を測定するには、以上の

事項に対する十分な考慮が必要になるのである。

2. 分子構造と移動率との数量的な関連

同種類の化合物について、系統的にその移動率を測定すれば、分子構造—特に置換基と R_f 値との間の数量的な関連を議論することができる。これについての Martin の法則は、元来分配クロマトグラフ系で導き出された理論であるが、筆者らは多種類のステロイド化合物の移動率をシリカゲルの TLC によって測定した結果、吸着系においても、これらの関係が近似的に成立することを見出した¹⁾。すなわち、

$$R_m = G_0 + mG_x + nG_y + \dots + G$$

（ここで $R_m = \log(1/R_f - 1)$, G_0 : 試料の基本骨格 So についての定数, $G = \log 1/\rho$ とする。）の式で表わされる加成性を仮定し、基本化合物およびそれに置換基を導入したものとの一対の R_f 値を R_m 値に換算してのち、その差から置換基のパラメーターを算出する。例えばシリカゲルを吸着剤、ベンゼン/アセトン（8:5 または 4:1）を展開溶剤とした場合、別々の化合物から一例としてつぎの値が得られる。

ΔR_m (11 β -水酸基のパラメーター): +0.358, +0.310
(16 α -水酸基): +0.726, (11 位のカルボニル基): +0.217, +0.184, (3 α -水酸基から 3 β -水酸基への変換): +0.073

これらのパラメーターは、必ずしも厳密な定数とはならない場合があるが、分子構造の確認、同定の基礎データとして利用価値が少なくないと考えられる。

分配系のガスクロマトグラフィー (GLC) によれば、その関係は一層正確であり、筆者らは、別に GLC によるステロイドの置換基のパラメーターを算出し、保持時間の予測、分子構造の推定が可能なことを見出している（図 5）。

図 5

例) 基本の化合物 I を選び、コレスタンを標準とする
比保持時間 RRT (ただし、固定相: 1% SE-30) の対数
値に、 $I \rightarrow II$ の変換のための $4^4 \rightarrow 5\alpha\text{-H}$ への還元のパ
ラメーター $\Delta RRT: -0.086$ および $17\alpha\text{-Me}$ の導入のパ
ラメーター $+0.037$ を加えて得た計算値は、実測値と良
一致を示す。また、III の例も同様である ($I \rightarrow III: \Delta RRT$

(A-ノル) : -0.208 , $(17\beta\text{-水酸基のアセチル化}) \pm 0.149$

3. 吸着の機構について

以上の方法で求めたパラメーターを利用すれば、吸着剤と試料との相互作用、吸着機構などの推定が可能である。

图 6

従来、液相カラム用の吸着剤として広く使用されたアルミナの吸着は、図6のような機構によるものと推定されている。アルミナ表面の酸素原子が水素原子の受容体となり、Hの結合する原子の電気陰性度が小さくなると、その吸着は弱くなる ($O-H > N-H \gg C-H$)。Alは金属性をもつので Al-O の分極はかなり大きく、Al-O-H の共有結合の形成による非可逆的な吸着や試料の異性化が起こり易い。また芳香族炭化水素の吸着は、アルミナの表面に、摩耗によって露出した少数の Al^+ イオンとの π -錯体の形成によるものと考えられる。一方、TLCに多く用いられるシリカゲルは、Alより金属性の小さいSiが中心原子をなし、シロキサン構造、シラノール基と水酸基、カルボニル基などの水素結合の形成は可逆的で、その機構も比較的単純であるから、クロマトグラフ用の吸着剤として有利な点が多い (TLCの普及にとまって、カラム用の吸着剤にもシリカゲルを用いることが多くなり、アルミナの使用頻度は減少した)。

さて、吸着に対する置換基の効果を考察する場合、先に述べたパラメーターが有効に利用できる。つぎに筆者らが、数十種のステロイド系医薬品の系統的な分析によって求めたパラメーターの中から、二三のものを選んで考察を試みてみよう（図7）。

これらはシリカゲルを吸着剤とし、ベンゼン／アセトン（4：1）を展開剤としたときの2-ホルミル基の導入および16 β -メチル基～16 α -メチル基の変換のパラメータを示す。ステロイドの3位のカルボニル基の隣りに導入したヒドロキシメチレン基のパラメータは、通常の水酸基より小さく、それは分子内水素結合の存在または互変異性体であるケト型として吸着されることを推定させる。また、16 α -メチル基と16 β -メチル基との変換により、吸着の大きさが大きく変えることは、シリカゲル表面とステロイドの α -側との吸着を、16 α -位のメチル基が妨害していることを暗示し、16 β -メチル基では17 α 位の水酸基が、この物質の吸着にかなり関与しているこ

図 7

	Rf values		
	C ₆ H ₆	MeOH	
	0.16	0.90	<p>Methanol-complex</p>
	0.28	0.85	

図 8

とを物語る。

以上のほか、展開溶剤にアルコール類などを用いた場合、Rf 値の逆転が観察されている。例えば図 8 に示すように、メントール、イソメントールの Rf 値は、ベンゼン、メタノールを展開剤とする場合で、その順位を逆にしてしている。これはエクアトリアル配置の水酸基とメタノールとのコンプレックスの形成により、吸着力が減少したものと説明される。このように、溶剤の種類によって Rf 値の順位が変動するのである。

移動率およびこれを変動させる諸因子について考察することは、吸着機構の推定と分子構造の推測に役立ち、また逆に分子構造が知られていれば、これらの基礎データは、吸着剤、溶剤の選択に有効に利用できるであろう。

文 献

- 1) 原昭二：日本化学雑誌 86, No. 12 (1965).