

薄層クロマトグラフィーにおける スポット面積と重量の関係

新井 義夫

見陣 章彦

(昭和41年10月28日受理)

The Weight-Area Relationship in Thin Layer Chromatography

by Yoshio ARAI and Akihiko MIJIN

Abstract

It was shown that the logarithm of the spot area was a linear function of the logarithm of the weight of material in thin layer chromatography of Nitrobenzene and Aniline, and the following experimental equation was proposed:

$$W = C \cdot A^n$$

where W is the weight of material, A is the area of a spot, n and C are a constant respectively.

The experiment was carried out on a large chromatoplate on which several spots were chromatographed simultaneously, and good reproducibility was obtained.

1. 緒 言

薄層クロマトグラフィーを利用する定量分析については、これまでに種々の方法が報告されている。このうちで薄層クロマトグラムにあらわれたスポット面積を測定し、重量を求めるのが最も簡便な方法と思われる。スポット面積と重量の関係を大別すると、つぎの2種類になる。

まず、ペーパークロマトグラフィーでは、Fowler¹⁾が重量の対数とスポット面積の対数の間に直線関係が成立することを報告している。

$$\log W \propto \log A \quad (1)$$

ここで、 W は重量を、 A はスポット面積をあらわす。

薄層クロマトグラフィーについては、重量の対数とスポット面積の平方根が直線関係にあると Purdy ら²⁾が報告している。

$$\log W \propto \sqrt{A} \quad (2)$$

著者らは、薄層クロマトグラフィーにおいて、ニトロベンゼンおよびアニリンを試料としてスポット面積と重量の関係を求めたところ Fig. 1 に示すように、(2) 式では曲線となり Purdy らの所論に従わず、(1) 式で直線関係が成立することを見出した。

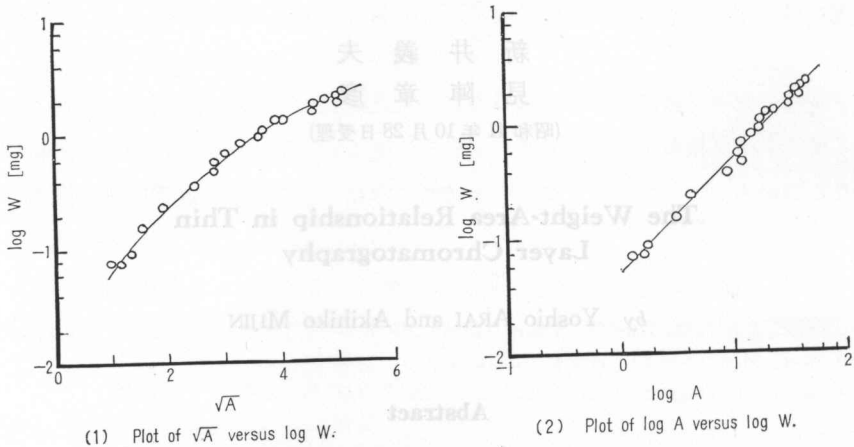


Fig. 1. Relationship between weight and spot area.
Sample: Nitrobenzene.

この事実を確認するために、大型クロマトプレートを使用する多数スポット式によって実験を行ない、一応の成果を得たので以下にその詳細を報告する。

2. 実 験

薄層クロマトグラフィーでは、幅の狭いガラス板 (5×20 cm) を用いてクロマトプレートを作り、これに一点ずつスポットする方法、すなわち一プレート・一スポット式が広く行なわれている。Fig. 1 もこの方法で得た結果である。

薄層クロマトグラムは、吸着剤・乾燥温度・乾燥時間・層の厚さ・展開剤・展開距離・展開温度等によって影響を受けるが、これらを厳重に規整しても、スポット面積の再現性は必ずしも良くならない。したがって、一プレート・一スポット式ではばらつきが生ずることを避けることはできない。

しかるに、同一プレート上にいくつかの試料をスポットする多数スポット式においては、前記のばらつきの原因を除くことになるので、スポット面積と重量の間の正確な関係を求めることができると思われる。

2-1. 実験方法

ガラス板は2次元展開用の市販品 (20×20 cm) を使用した。シリカゲル G (メルク社製) に2倍量の蒸留水を加えて練り、アプリケーター (ヤマト科学器械製、層の厚さ 0.25 mm) を用いてガラス板に塗布し、100°C で 1 hr 乾燥したのちデシケーターに保存して使用した。仁丹テルモ社製マイクロシリンジ MS-01 (1 μl) を用い、プレートの下端から 15 mm のところに試料

をスポットした。展開液の深さは最初7 mmとし、室温で上昇法により10 cm展開した。検出はヨウ素蒸気法³⁾によった。試料のニトロベンゼンおよびアニリンは、それぞれのクロマト純品を使用した。

展開液の組成を Table 1 に示した。このうち、A 液はニトロベンゼンのみを展開させる目的のもの、B 液はニトロベンゼンとアニリンの混合液を展開した時、完全に分離させるためにえらんだのものである。展開液はいずれも市販特級品を使用した。

Table 1. Developing solvent

Type	Component	R _f value	
		Nitrobenzene	Aniline
A	(Petroleum Ether):(Bznzene) = 4:1	0.64	0.15
B	(Petroleum Ether):(n-Hexane):(Ethyl Acetate) = 20:3:3	0.73	0.34

面積測定は、複写用印画紙 (フジグラフ CP-C) に焼付し、現像・乾燥後デンケーター中に一夜保存してからスポット部分を切り抜いて秤量し、その重量で面積をあらわすことにした。

2-2. 実験結果

(i) 単一試料

まず、同一クロマトプレートに同一量の試料を多数スポットして展開させた場合のスポット面積のばらつきを調べた。ばらつきは変動係数であらわし、この結果を Table 2 に示した。なお、一プレート・一スポット式の場合は Table 3 であった。したがって、多数スポット式を用いるとスポット面積のばらつきが減少し、また、最良条件の精度が $100 \pm 2\%$ という文献値²⁾ とほぼ同じ精度が、容易に得られることがわかった。

Table 2. Variation of spot area (Difference according with spotting)

Developing solvent	A	B
Nitrobenzene	1.22~4.88% av. 3.09%	0.99~4.56% av. 2.46%
Aniline	—	0.92~3.34% av. 2.27%

Table 3. Variation of spot area (Difference according with plate)

Developing solvent	A	B
Nitrobenzene	1.74~17.04% av. 9.86%	—
Aniline	—	7.15~10.26% av. 9.96%

なお、薄層の周端では中心部よりも R_f 値が高くなる周辺現象 (Edge-phenomena)³⁾ が認められている。同じような現象がスポット面積にも生じて、周辺およびスポット相互の影響に

より面積も変化することが予想される。しかし、薄層の側端と各スポットの間隔がそれぞれ約 10 mm ではこれらの影響が認められなかったので、以下の実験はすべてこれ以上の間隔を保つようにした。

つぎに、同一クロマトプレートに重量を変えて数点スポットして展開させた。実験結果をグラフに描くと、ニトロベンゼンおよびアニリンについていずれの場合も、スポット量が多くなると $\log W - \sqrt{A}$ の場合は、直線よりはずれて曲線となる傾向を示した。これに反して、 $\log W - \log A$ ではいずれも直線関係が成立することを認めた。Fig. 2 にこの一例を示した。

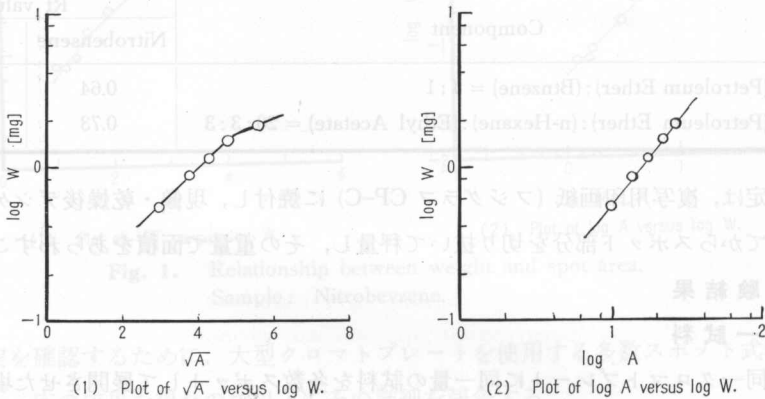


Fig. 2. An example of experimental results with large plate. Sample: Nitrobenzene.

Table 4. Variation of spot area (Influence with binary mixture)

Developing solvent	A	B
Nitrobenzene	0.84~4.73%	2.56~5.56%
	av. 3.69%	av. 4.09%
Aniline	1.32~3.61%	0.86~5.77%
	av. 2.11%	av. 4.44%

(ii) 混合試料

ニトロベンゼン、アニリンの等量混合試料を作り実験を行なった。まず、スポット面積のばらつきを調べるために前項と同様に同一クロマトプレートに同一量を多数スポットした。この結果は Table 4 に示すように、単一試料の場合とほぼ同程度のばらつきであった。

つぎに、同一プレートにスポット量をいろいろに変えて展開させた。結果は前と同じように対数-対数のグラフが直線となることを認めた。この一例を Fig. 3 に示した。

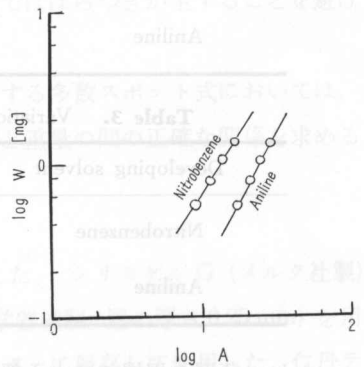


Fig. 3. Experimental results for binary mixture with large plate.

3. 考 察

2. に示した実験結果から、薄層クロマトグラフィーのスポット面積の対数は重量の対数と直線関係にあると考えられる。したがって、ペーパークロマトグラフィーで成立する(1)式の関係が、薄層クロマトグラフィーにもあてはまるものと思われる。(1)式を書き換えて、 $\log W = n \cdot \log A + \log C$ すなわち、つぎの実験式が成立する。

$$W = C \cdot A^n$$

ここに、 C および n は試料およびクロマトグラフィーの条件によってきまる定数である。

このことから、定数または検量線をあらかじめ求めておけば、スポット面積の測定により試料の重量を求めることができる。

すなわち、大型クロマトプレートを使用する多数スポット式によって、定量しようとする成分のクロマト純品または含有量既知の標準品を、同一プレートに多数スポットすることによって同時に検量線を作り、スポット面積の測定から重量を求める簡易な定量分析に利用できるものと思われる。

終りに本研究報告の校閲としていただいた本学佐々木満雄教授に謝意を表す。また、本報告の実験中クロマトグラムの印画紙への転写法は、本学の伊藤研究室で既に利用されていた方法であり、種々便宜を供与下さった伊藤昌明教授に謝意を表す。

(昭和41年8月30日、日本化学会北海道支部大会にて講演)

引用文献

- 1) H. D. Fowler: *Nature*, **168**, 1123 (1951).
- 2) S. J. Purdy and E. V. Truter: *Analyst*, **87**, 802 (1962).
- 3) たとえば、鈴木郁生, “薄層クロマトグラフィーの実際”(1964), 広川書店.