

## 第2節 薄層クロマトグラフィ

薄層クロマトグラフィ (TLC : Thin-Layer Chromatography) とは、支持体に薄く塗布された微粉末を固定相とし、適当な溶媒を移動相に用いて行う、一種の液体クロマトグラフィである。

**【原理】** 支持体としては、ガラス、アルミニウム、プラスチックなどが用いられる。固定相には、各種の微粉末が用いられ、それぞれの性質により吸着、イオン交換、分配、分子ふるいなど様々な機構による分離法が選べる。移動相 (溶媒) とともに試料が移動するときに、固定相と親和性の高いものは相互作用しながら移動するため速度が遅くなる、反対に固定相と親和性の低いものは、その速度が速くなる。この様な機構により、試料中の物質を分離できる。また、一度分離 (展開) した後、異なる移動相または異なる方向 (X軸方向から、Y軸方向へ) に続けて展開する2次元薄層クロマトグラフィもある。2次元薄層クロマトグラフィでは、試料を異なる2種の特徴により分離するため、分解能はあがる。

原理的には、多種多様の物質の分析に用いることができるが、実際には、脂溶性物質の分離、分析に主に用いられている。

TLC には、以下に示す多くの利点がある。

- 1) 分離時間が短い。
- 2) 簡易な設備で行える。
- 3) 多数のサンプルを同時に解析できる (比較できる)。
- 4) 呈色反応及び移動様式から構造を推定できる。
- 5) 定量および分取が可能である。

### 【器具・薬品類】

#### 1) 薄層プレート

一般的な支持体としては、厚さ 3mm、縦 20cm、横 20cm の透明な硬質製のガラス板を用いる。このガラス板に固定相を 25 $\mu$ m の厚さに塗布する。固定相としては、原理的にはカラムクロマトグラフィ用のものが使用可能であるが、実際には、ケイ酸をベースにしたものが圧倒的に多く使われる。

以下に脂質の分離に使われる代表的な固定相とその性質を記す。

| 固定相            | 特徴  |
|----------------|---|
| シリカゲル          | 脂質一般、特に酸性リン脂質の分析、調製に用いられる。  |
| シリカゲル-硫酸カルシウム  | シリカゲルに固着剤として硫酸カルシウムを加えたもの。シリカゲルと同様に脂質一般の分析に使われる。                              |
| シリカゲル-ホウ酸ナトリウム | シリカゲルとホウ酸を混合したもの。モノグリセリド、グリセリルモノエーテルなどの分析によく使用される                             |
| シリカゲル-硝酸銀      | シリカゲルと硝酸銀を混合したもの。不飽和度の異なる同種脂質や幾何異性体の相互分離に使用される。                               |
| 疎水シリカゲル        | シリカゲルを塗布したプレートをエーテル、パラフィン、シリコン等で処理したもの。逆相用プレートとして脂肪酸、脂肪酸エステル、グリセリンなどの分離に使用される |

#### 2) 溶媒系 (移動相)

移動相となる溶媒は、解析、分離しようとする物質、および、薄層プレートの特性により選択する。脂質の場合は、誘導脂質、単純脂質および複合脂質に大別されるが、酸・塩基性の程度や極性の程度など多種多様である。そのため、分析する試料により使用する溶媒 (移動相) を選択する。単純

脂質の場合は、ヘキサン・エーテル・酢酸などを含むものが一般的である。複合脂質の場合、クロロホルム・メタノール・水を含む溶媒系が一般的であり、それらの比率を変えた溶媒系を選択する。一般的には、極性の低い試料の場合は、水を少なくしクロロホルムの比率を上げる。極性の高い試料の場合には、メタノールと水の比率を上げる。以下に代表的な溶媒系とその特徴を記す。

代表的な溶媒系

|          |   |
|----------|---|
| 単純脂質の分離用 | ①ヘキサン：エーテル（100：0～90：10など）<br>②ヘキサン：エーテル：酢酸（90：10：1，50：50：1など）<br>など |
| 複合脂質の分離用 | ①クロロホルム：メタノール：水（65：25：4）<br>②クロロホルム：メタノール：酢酸：水（25：15：4：2）<br>など     |

**【展 開】**（脂質試料を例に）

1) 着点

試料の脂質をクロロホルムやエーテルに溶かし、毛細管またはマイクロシリンジで薄層プレートに着点（スポット）する。スポットはできるだけ小さい円形で、試料間で大きさが一定になるのがよい。

2) 展開

上昇法，下降法，円型法，多重法などがあるが，もっとも一般的なものは上昇法である。ガラス製展開槽に深さ数cmになるように移動相になる溶媒を入れ，1～2時間放置し槽内の溶媒蒸気を平衡にする。着点した薄層を展開槽に入れ，蓋をした後，溶媒がプレートの上端から2cm程度のところに来るまで放置する。（この操作を展開という）プレートを取り出し，乾燥させる。

**【検 出】** 展開したプレートを各種検出試薬で処理して，試料中の成分を検出する。試料の特性により，検出試薬を選択する。各種脂質の検出に用いられる一般的な検出方法を下記する。また，モノクローナル抗体を用いて，高感度に特異的に特定の成分を検出する免疫染色法もある。

| 検出する脂質 | 検出方法（特徴）   |
|--------|--|
| 脂質一般   | 硫酸法（全ての脂質が褐～黒色のスポットとして現れる。）<br>ヨウ素法（脂質は黄から褐色のスポットとなる。飽和脂肪酸より不飽和脂肪酸の方が呈色は強い。） |
| リン脂質   | Dittmer 試薬を用いる方法（リン酸部分をモリブデン酸と反応させる）   |
| コリン脂質  | Dragendorff 法（コリン脂質に特異的）   |
| アミノ脂質  | ニンヒドリン法（アミノ基含有脂質やアミノ酸脂質を微量でも検出できる。）  |
| 糖脂質    | アスロン法（糖部分アスロン試薬を反応させる）<br>ナフトール法（糖脂質を青～赤紫色に，他の複合脂質は黄色に，コレステロールは灰～赤色に呈色させる。）  |

**【同 定】** 得られた各スポットのRf値を標準物質のRf値と比較し，物質の同定を行う。

**【定 量】** 一般に薄層で展開された試料は，検出操作をした後，デンストメーターを用いて定量され

る。また、放射性同位元素を用いてオートラジオグラムにより定量することもできる。脂質の定量には、試料を水素炎中でイオン化しつつ水素炎イオン化検出器で検出定量する方法がある。

**【分 取】** 展開した薄層プレートから目的の物質を回収することができる。

適当な検出反応を行い、目的物質の位置を確認した後、その部分を固定相ごと掻き取る。適当な溶媒を用いて目的物質を溶出させる。必要に応じて、精製を行う。脂質の場合、固定相を掻き取った後、クロロホルム、エーテル、メタノールを含む溶媒で抽出した後、ガラスフィルター等で固定相を取り除き、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮する。抽出液から、不純物を除くには、Bligh-Dyer 法が有効である。

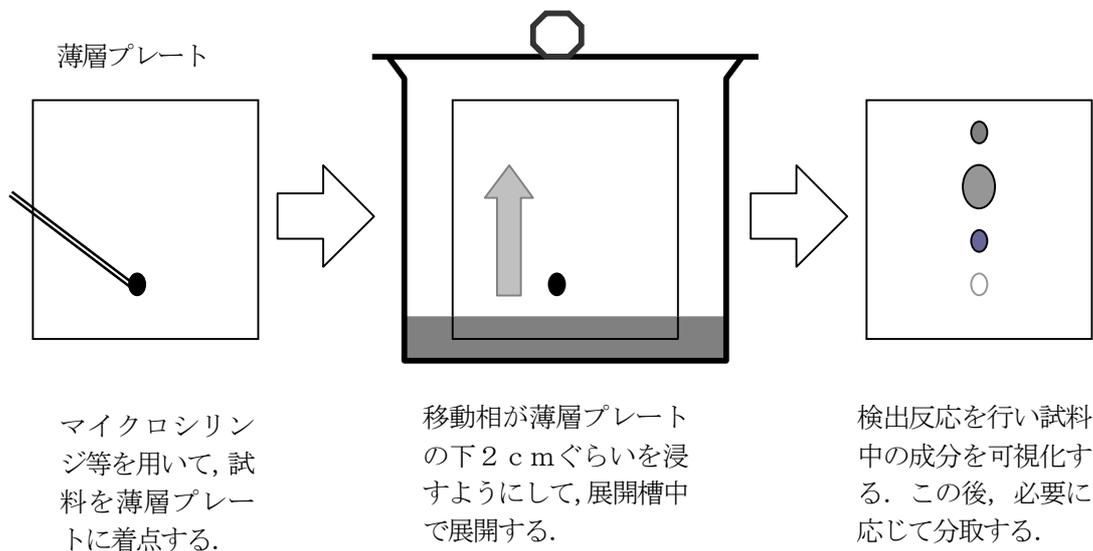


図 薄層クロマトグラフィの概略

### 第3節 ガスクロマトグラフィ

ガスクロマトグラフィは、クロマトグラフィの中でも代表的なものであり、その呼称は移動相に気体（ガス）を用いることに由来する。特に、低分子有機化合物の分離を得意とし、汎用性が高い。ガスクロマトグラフィには、固定相に高沸点液体を用いる気-液クロマトグラフィ（GLC: Gas-Liquid Chromatography）と、固定相に固体を用いる気-固クロマトグラフィ（GSC: Gas-Solid Chromatography）がある。主に前者では分配により、後者では吸着により成分を分離する。

**【原理】** 揮発性の試料を気化室で気化し、移動相（キャリアガス）とともに、恒温槽内で室温から400℃程度に保たれたカラムに送り込まれ、ここで試料成分の分離を行う。カラム内の固定相と各試料成分との親和性の違い（吸着性、溶解性、化学結合性など）により、各成分のカラムを通過する時間が異なってくる。各成分のカラムの通過時間を検出器により検知し、分離・同定を行う。

**【特徴】** ガスクロマトグラフィには、以下のような特徴がある。

- 1) 理論段数が非常に高く、成分の分離能が高い（高分解能であり、複雑な混合物の分離が可能）。
- 2) 分析に用いるカラムの種類が豊富で目的にあったものを選べる。
- 3) 検出器の種類が豊富で選択性が高く、高感度で検出可能である（微量分析が可能である）。
- 4) 分離時間が短い。
- 5) 操作が簡便である。

短所としては、移動相に気体を用いるという性質から、分析できる試料は気体中で移動できるものでなければならない。つまり、気体そのものか、温度をかけることにより揮発して気体になるものでなければならない。また、分離は通常高温で行われるため熱に安定な試料でなければならない。揮発性でない試料や高温で不安定な試料については、誘導体化し揮発性で熱安定にする必要がある。

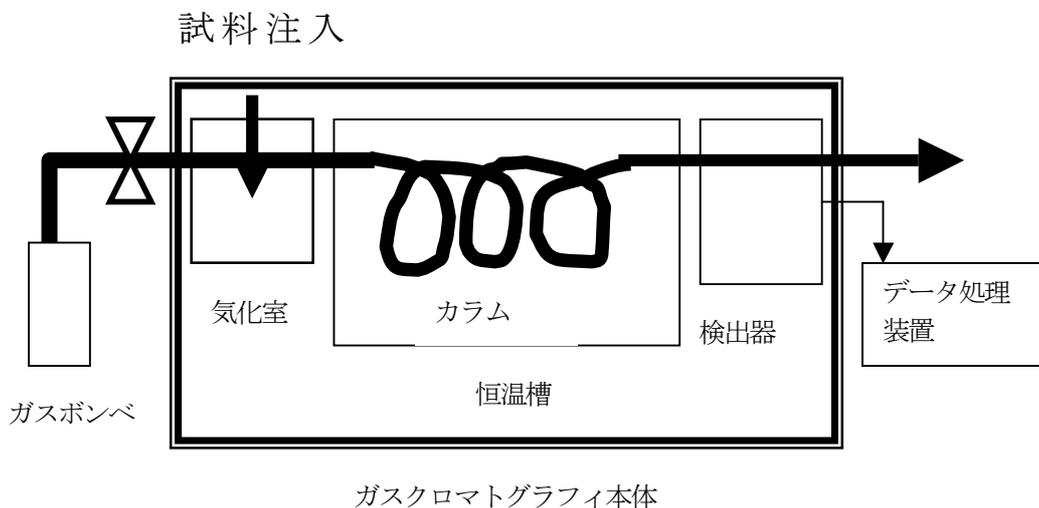


図 ガスクロマトグラフィの概略

**【移動相（キャリアガス）】** キャリアガスは、ガスポンペより減圧調整器を通してカラムに送られる。一般的にはヘリウムおよび窒素が、キャリアガスとして使用される。

**【固定相】** ガスクロマトグラフィに使用される固定相は多数あり、試料の特性により選択される。

固定相は概ね、非極性及び極性に分類される。非極性のものとしては炭化水素、シリコンオイル、シリコングリースが一般的である。極性のものとしては、高分子ポリエステル、ポリエチレングリコール、アミンなどがあり、シリカやアルミナはもっとも高極性の固定相である。液体固定相の場合は、不揮発性で、高温でも安定な物質でなければならない。

**【カラム】** 成分の分離は、カラム内で行われる。カラムは、ステンレス鋼、ガラス、シリカ管でできており、長さ 1-100m、内径 0.1-3mm のコイルである。カラムは、その形状から、パックドカラム（充填カラム）とキャピラリーカラム（オープンチューブカラム、毛管カラム）に分けられる。パックドカラム：内径 2-3mm、長さ 2-3m でカラム内に固定相が充填されてある。処理できる試料量が多い、固定相の種類が豊富である、安価で丈夫である、といった利点を持つ。しかし、管内が固定相で満たされているため、圧力損失が大きくカラムを長くできない、多流路拡散を起こす、内径が大きいという理由からシャープな分離が得られない。キャピラリーカラム：管の内壁に主に液相の固定相が塗布されたカラム。カラム中央部は空洞のため圧力損失が少なくカラムを長くできる、カラムの内径が小さいという特徴からシャープな分離が可能である。しかし、処理できる試料量が少ない、液相固定相の種類が少ないという短所がある。

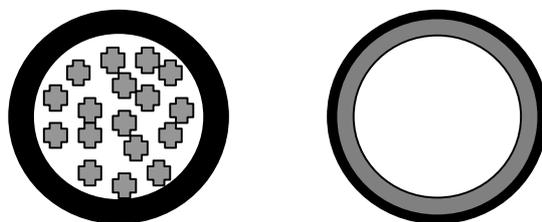


図 ガスクロマトグラフィに用いるカラムの断面

左側は、パックドカラムの断面図を示す。カラムの管の肉厚が太く、カラム内には固定相がぎっしり詰まっている。右側は、キャピラリーカラムの断面図を示す。カラムの肉厚は薄く、固定相はカラムの内壁に塗布されており、中心部は空洞である。

**【検出器】** 検出器ではキャリアガスとともにカラムから溶出されてきた試料成分の質量または濃度を電気的信号に変換して記録する。ガスクロマトグラフィに用いることができる検出器は多種多様なものがあり、分析する試料の特性に合致したものを選べば選択性が高く非常に微量の成分を検出することが可能である。以下に、代表的な検出器を概説する。

熱伝導度検出器(TCD; Thermal Conductivity Detector)：一般的にキャリアガスとして用いられるヘリウムは、熱伝導度が高い、つまり、周囲の熱を奪いやすいという性質を持つ。キャピラリーの出口に、電気的に熱せられたフィラメントを配しておく。ヘリウム（キャリアガス）のみがこのフィラメントを通過している間は、奪われる熱量が一定であるが、ヘリウム（キャリアガス）とともに試料成分が含まれると熱伝導度が低下しフィラメントの温度低下が小さくなる。これを電気的信号に変えて記録する。この方法では、ヘリウム（キャリアガス）以外のすべての物質を検出できる。水素炎イオン化検出器(FID; Flame Ionization Detector)：近年もっとも一般的に用いられている検出器である。カラムの出口に水素の炎を配し、ここにカラムからの試料成分が到着し、燃焼する際にその一部がイオンとなる（下図）。このイオンをコレクタで捕集し電気的信号に変換して記録する。FID はきわめて高感度であるが、有機物（炭素原子を含むもの）しか検出できない。



(酸化) 図 水素炎により生じるイオン

**【試料成分の同定】** ガスクロマトグラフィでは、分析条件が一定であれば非常に再現性の良い結果が得られる。この特性を利用して、各試料成分の同定は、標準物質との溶出時間の比較により行われる。