

薄 層 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー

——有機化合物への応用——

糸 川 秀 治*

1 ま え が き

天然物化学，生物化学などの分野においてはまず物質の分離および精製が重要な問題となる．複雑な天然物から目的の成分を分離する最も有効な手段はクロマトグラフィーであり，これなくしてはこれらの分野の発展は望めない．“吸着”カラムクロマトグラフィーは Tssett¹⁾ (1906年)により植物色素クロロフィルの分離に利用され，その後1931年 Kuhn, Winterstein, Lederer²⁾³⁾ はカロチノイドの研究にこの方法を応用した．以来天然物成分などの混合物を分離する有力な手段となった．1941年 Martin, Synge⁴⁾ は吸着の代わりに液体（シリカゲルに含まれる水などを）固定相とする“分配”カラムクロマトグラフィーを開発し親油性化合物のみならず，吸着法の適さない親水性の化合物にも応用できるようになった．

Consden, Gorden, Martin⁵⁾ は固定相にシリカゲルの代わりにろ紙（セルロース）を用いて，ろ紙分配クロマトグラフィー（paper partition chromatography, PPC）を開発し，微量分析技術を発展させた．

さらに進んで薄層クロマトグラフィー（TLC）にと発展したのであるが，これは次に述べるようにクロマトストリップ法（chromato strip method）からクロマトプレート法（chromato plate method）を経てしだいに発展してきた方法といえる．

1951年 Kirchner⁶⁾ ら⁷⁾が Meinhard⁸⁾の表面クロマトグラフィーにヒントを得てクロマトストリップ法と称する吸着ミクロクロマトグラフィーを発表した．本法は縦長のガラス片の一面に吸着剤（silicic acid）と固着剤 {binder, plaster (starch)} および水からなる 0.5～3 mm の層を作り，乾燥後使用する．精油成分の分析に応

用して好結果が得られたが，この方法は吸着剤の活性度や吸着の厚さの影響が大きく，分離能はきわめて良好であったが R_f 値の再現性に乏しかった．その後1954年 Reitsema⁹⁾ がクロマトストリップより広いガラス板に適用してクロマトプレート法を考案し， R_f 値の誤差が ± 0.03 にとどまるようになった．同年 Miller および Kirchner¹⁰⁾，1956年 Stahl¹¹⁾ らが平均した一定の薄い層を作る装置を開発して以来，薄層クロマトグラフィーとしてクロマトグラフィーの一分野を占めるようになった．

一方，1938年 Izmailov¹²⁾ らは吸着剤の薄層を作って円形に展開し，吸着法の微量化を試みている．ついで Crowe¹³⁾ も吸着剤をペトリざらに入れて同様な実験を行なったが，この種の実験はしばらく中断されていた．1955年 Mottier¹⁴⁾ らがふたたび取り上げ，近年ステロイド，香料などの分析にも応用された．

けっきょく，現在では薄層クロマトグラフィーは一般に物質の同定，純度の検定，反応の追跡などに迅速簡易な方法としてその応用は非常に広範囲に及び，それぞれの分野の発展に大いに貢献している．

本稿では薄層クロマトグラフィーの有機化合物への応用を主にして述べるが，なにぶんにも膨大な量の研究報告があるので詳しくは成書¹⁵⁾その他の文献を参照されるとよいと思う．ここでは基礎実験的な事項に関しての概略について既報¹⁵⁾との重複を避けながら述べてみたい．

実験操作は無機化合物の場合も有機化合物の場合もだいたい同じであるが，展開溶媒，検出操作などは化合物の種類により若干異なる．

2 薄層クロマトグラフィーの基礎

2.1 展開溶媒

展開溶媒の溶出力は透電定数，双極子能率とも関連が深い．単一な溶媒で適切な展開が行なわれない場合2種

* 東京薬科大学天然物薬品製造学教室：東京都新宿区
柏木4丁目

類以上の混合溶媒を用いると好結果が得られる。2種類以上の混合系ではその溶出順位は複雑で、展開溶媒を変えることにより吸着順位が逆転することがある。

展開溶媒の溶出順位：

n -hexane < heptane < cyclohexane < tetrachloromethane < trichloroethylene < benzene < chloroform < ether < ethylacetate < pyridine < acetone < ethanol < methanol < water

上記の順位は溶質の種類によっても微妙に左右されることがある。単一の溶媒で良好な結果が得られれば簡単であるが、実際には2種以上の溶媒を混合して使用する場合が多くその種類および比率の選定はむずかしい。たとえば炭化水素骨格のみの場合、溶媒も極性の少ないヘキサン、ヘプタンなどを用いるが、酸素、窒素その他の元素を含む官能基がはいってきた場合、化合物の極性も高まるので、それにつれて極性の強いものを選ばねばならない。混合溶媒の比率を変えてゆく場合も適宜化合物の極性を考慮すべきであって、ある化合物のベンゼン-酢エス(7:3)における R_f 値が小さいとき、その比率を(3:7)に変えれば R_f 値が大きくなる。またクロロホルム-メタノール(40:1)を(20:1)、(10:1)とメタノールの量を増してゆくにつれて当然 R_f 値は大きくなる。さらにベンゼン-酢エス(3:7)で分離がうまくゆかない場合、類似の極性を有するクロロホルム-メタノール(20:1)を用いて分離がうまくゆくこともある。けっきょくは類似化合物への応用例を参照し、溶質の化学構造などを考慮して実験的に決定してゆくのが望ましい。

2.2 化学構造と吸着との関係

この関係も各化合物群によって差があり、一律に断定はできないがだいたい次のようなことはいえる。

飽和炭素化合物はまったく吸着されないか弱い。二重結合は吸着性を少し強める。二重結合の数を増せば吸着性を増し、特に共役二重結合を導入すると分子の分極性を増加し吸着性を大きくする。

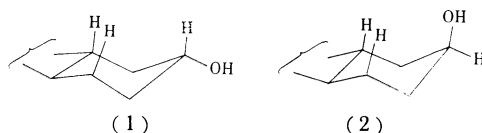
炭化水素に官能基を置換するとき、一般に吸着の強さは次のような順序になる。

$-\text{COOH} > -\text{CONH}_2 > -\text{OH} > -\text{NHCOCH}_3 > -\text{NH}_2 > -\text{OCOCH}_3 > -\text{COCH}_3 > -\text{N}(\text{CH}_3)_2 > -\text{NO}_2 > -\text{OCH}_3 > -\text{H}, -\text{Cl}$

カルボニル基は水酸基、アミノ基より弱い。芳香族化合物でも同様な傾向がある。しかし有機化合物は骨格的にも種類が多く、その差によって同様な置換基を有していても吸着力にかなり差が出てくるので、上記の順位によって R_f 値の順位を検討する場合も同一系統内の化合

物間で比較するのが望ましい。また溶媒系を変えることによって吸着に差がでることがある。

多数の置換基を有するとき、その吸着性に対する影響は単純に加成性とはかぎらない。また立体的な影響も考慮しなくてはならない。たとえば水酸基が立体的に異なる equatorial (1) または axial (2) の配位を有するときは、(1)のほうは立体障害が少ないので固定相に吸着されやすい。したがって(1)のほうは(2)よりも R_f 値が低い。



2.3 ペーパークロマトグラフィーとの相違¹⁶⁾

TLC と PPC との本質的な差は固定相にあり、TLC では拡散による影響が少ない。確認限度は小さく、展開距離、時間は短縮される。これらの利点は固定相を構成する吸着剤・担体が“粉体”としての諸性質を有し、微粒子で表面積の大きいこと、移動相のすみやかな展開を可能にする毛管構造、支持体のガラス板への固着性などに由来する。TLC では PPC と異なり、吸着剤・担体の種類に制限がなく、分離の原理は広範である。シリカゲルは PPC でみられる分配および吸着を主とするがイオン交換作用も認められる。

TLC は PPC より迅速、鋭敏である。そのため展開の方法については特別の考慮が払われねばならない。溶媒蒸気の飽和の効果はその最も大きなもので、再現性のよい結果を得る重要な条件である。

TLC が PPC よりすぐれた点の一つは、検出試薬の発色条件に制限がなく、その色調の多様性は定性的な検出、同定に偉力を発揮する。

TLC のない時期には、比較的官能基の少ない脂環状化合物などは PPC ではスポットのまとまりがわるく、また検出試薬に限度があり、ステロイド、トリテルペンなどの化合物では事実上検出が困難なものが多かった。事実トリテルペンの検出の際にろ紙の上で Liebermann-Burchard 反応を行なって呈色を見る必要上濃硫酸を噴霧するという報告があったほどである。当然のことながらろ紙は溶けてしまうので15分以内に色調を見なければならなかった。TLC は腐食性の試薬にも耐えるのでそのような不便さはなくなり、その方面の化学に大きな進歩をもたらした。

によると、厚さ 1 mm, 20×20 cm のシリカゲル層は 5 ~ 25 mg の試料を分離するという。試料は原線に沿って帯状につける。展開後、試料のバンドを確認するには、それぞれの化合物に合った検出法を選んで行なう。紫外線(UV)などで確認できる場合はよいが、腐食性試薬などを用いる際は全体に噴霧すると試料がだめになってしまうので、1~2 箇所縦に細いすき間を設けそこだけ発色させてバンドを確認する。試料のバンドが確認できたら、その部分に印をつけ、担体をスパーテルなどでかきとる。担体から溶媒によって試料を溶出する場合、比較的少量の溶媒で能率よく抽出することが好ましい。そのための装置¹⁸⁾も考案されているが、簡便にかきとった担体を細いカラム管に詰め溶媒で流出させればよい。

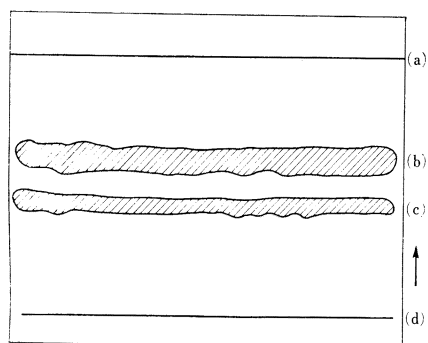


図 3 分取 TLC

(a) 前線; (b) 試料A; (c) 試料B; (d) 原線

3.3 二次元展開

混合物の各成分を一方向の展開で分離できないとき、PPC で繁用されている二次元展開法を用いる。PPC の場合と同様に移動率の異なる二種の溶媒系の特色が生か

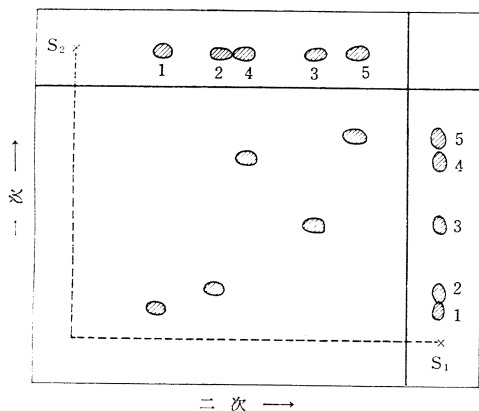


図 4 二次元展開法

されるので、複雑な混合物の分離と同定に好結果を与える。

一次、二次の展開には試料の移動率がなるべく異なる溶媒を選ぶとよい。同一の溶媒を用いた場合はスポットが対角線上に並ぶだけで好結果は得られない。また再現性を確実にするためには、二次展開の前の乾燥処理は一定の条件で行なわねばならない。

3.4 乾式薄層クロマトグラフィー

吸着剤をかいたままガラス板に散布して薄層を作る方法もある。この方法は、薄層の作り方が簡単で特別の装置の必要はなく、活性化が不要、また活性度の高いアルミナなどが直接使用でき、展開時間も短い(10~20分)。スポットのかきとり、抽出も容易で比較的極性の小さい溶媒で展開しうる化合物などには好適と思われる。しかし欠点としては、吸着剤が固定していないために薄層が破損しやすく、検出試薬の噴霧やその他の取り扱いに注意を要する。

吸着剤にはカラムクロマトグラフ用のアルミナまたはシリカゲルなどを用い、溶媒はヘキサン、ベンゼン、エーテルなど比較的極性の弱いものを使用する。適当な大きさのガラス板を用意し、この上に吸着剤を平らに広げる(2~3 mm ぐらいの厚さ)。ついでガラス棒をゆっくりと一端から他端へ移動させていく。均一な薄層を作るためにはガラス棒は回転させずに移動する必要がある。ガラス棒の両端に巻いたテープなどの厚さによって薄層の厚さは調節できるが普通は 1 mm ぐらいのものを使用する。この薄層は傾斜させたり振動させるとくずれるの

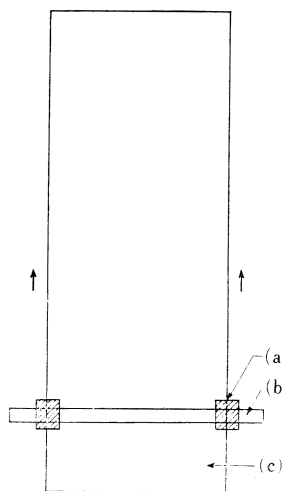


図 5 乾式プレートの作り方

(a) テープ; (b) ガラス棒; (c) ガラス板

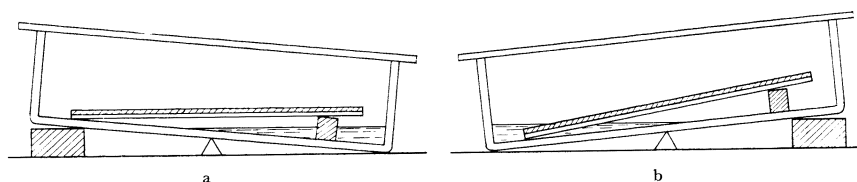


図 6 横型展開そう

で、取り扱いには注意を要する。

試料をつけたあとに展開するが図 6 に示すような横型の展開そう¹⁹⁾を用意し、容器にはあらかじめ高さ 5 mm 程度の溶媒を入れておく。またプレートと容器の底との角度が約 20 度になるように適当な台を入れておく。

10~20分でアルミナの場合は展開を終わり、シリカゲルの場合はほぼ 2 倍の時間がかかる。

検出のためには、UV 下で観察するのがよいが、けい光が認められない場合は発色試薬を噴霧する。あまり薄層の近くで噴霧すると薄層がこわれてしまうので、やや遠い距離から軽く噴霧する。

3.5 検出法

展開後のスポットは種々の方法で検出、確認される。試料の種類と検出方法によって差異はあるが、TLC の確認限度は PPC よりもはるかに小さい。一般には各化合物に対して特異的な試薬を噴霧して検出するが、TLC の場合はそれに加えて腐食性試薬を用いることができる特徴を有し、種々の試薬が考えられる。次に一般的に用いられる検出法について述べる。

(1) 紫外線 (UV) 無色の物質であっても UV 下にけい光を発して検出できる場合が多く、非破壊的な方法として非常に有能である。光源としては長波長 (3650 Å) と短波長 (2536 Å) の紫外線ランプが用いられる。

(2) けい光試薬 UV 下でけい光を発しない物質でも、あらかじめ固定相にけい光剤を入れておけばスポ

ットを UV 下に暗点として検出できることが多い。たとえばシリカゲルの薄層を作るとき、水の代わりにけい光試薬を加えた水溶液を用いる (例: シリカゲル 30 g に 60 ml の 0.04% フルオレセインナトリウム溶液を加える)。

(3) 発色試薬 UV 下で検出できない場合には、それぞれ特定の試薬を薄層上に噴霧するが、次に一般的にどのような化合物群にも応用される試薬をあげてみる。試薬噴霧後 UV 下で検することもある。

a) 硫酸: 種々の濃度の硫酸を用いる。噴霧ののちに加熱する (100~120°C, 10分)。ステロイド、テルペン、その他の化合物で特異的な呈色を示す場合が多い。

b) 過マンガン酸カリウム-硫酸: 過マンガン酸カリウム 0.5 g + 濃硫酸 15 ml 100~120°C, 10分

c) 重クロム酸カリウム-硫酸: 重クロム酸カリウム 3 g + 水 20 ml + 濃硫酸 10 ml

d) ヨウ素: 密閉した容器にヨウ素を入れ、その中にプレートを入れて発色させる。多くの化合物はかっ色のスポットを与える。

e) 三塩化アンチモン: 三塩化アンチモン 25 g + クロホルム 75 g 100~110°C, 10分

f) 五塩化アンチモン: 五塩化アンチモン 25 g + 四塩化炭素 80 g 100~120°C, 10分 一般に紫灰色を呈する。

表 1 に従来用いられている各化合物群に対する検出試薬の概要を示す。

表 1 発 色 試 液

| 化合物群 | 試 液 | 備 考 | 化合物群 | 試 液 | 備 考 |
|------|--|-------------------|-------------|---|-----|
| アミノ酸 | ニンヒドリン試液 (1) 0.25% ninhydrin/(CH ₃) ₂ CO (2) 0.3% ninhydrin/n-C ₄ H ₉ OH (3) 4% ninhydrin/pyridine (4) ニンヒドリン-硝酸銅試液 (a) 0.2% ninhydrin (C ₂ H ₅ OH 50 ml + CH ₃ COOH 10 ml + 2,4,6-collidine 2 ml) (b) 1% Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O/C ₂ H ₅ OH (a) および (b) 液を使用直前 50:3 の割合に混合 | 有色錯塩形成 (多発色試薬) | ペプチド | (1) 0.3% ninhydrin/C ₂ H ₅ OH (2) アミドブラック 10B 飽和 CH ₃ OH-CH ₃ COOH-H ₂ O ²⁰⁾ (3) 0.2% ボンソー S/10% CH ₃ COOH | |
| | | | 天然フェノール成分一般 | (1) ジアゾ化ベンジジン (a) benzidine 5 g + HCl 14 ml + H ₂ O (全量 1 l) (b) 10% NaNO ₂ /H ₂ O (a), (b) を用時等量ずつ混和 (2) ジアゾスルファニル酸 (Pauly 試液) | |

| 化合物群 | 試液 | 備考 | 化合物群 | 試液 | 備考 |
|---------------------|--|---|---|--|-----------------------------|
| | diazosulfanilic acid 0.1 g を用時 1% NaOH/H ₂ O 20 ml に溶かす | | | aniline 0.93 g + <i>o</i> -phthalic acid 1.66 g + 水飽和 C ₄ H ₉ OH 100 ml | 100~120°C, 10分 |
| (3) Echtblausalz B | 安定なジアゾニウム塩の0.5% 水性液 次に 0.1N NaOH soln. 噴霧 | | (2) ナフトレゾルシン | | 還元糖 |
| (4) Echtblausalz BB | 0.1% CH ₃ OH soln. | 80~100°C | (イ) naphthoresorcine-H ₂ SO ₄ 0.2% naphthoresorcine- C ₂ H ₅ OH + 20% H ₂ SO ₄ (1:1) | } | 100~105°C, 10分 |
| (5) ベルリン青反応 | (a) 5~10% FeCl ₃ (b) 5% K ₄ [Fe(CN) ₆] (a), (b) の順に噴霧 | 濃青色 | (ロ) naphthoresorcine-H ₃ PO ₄ 0.2% naphthoresorcine- C ₂ H ₅ OH 溶液 + H ₃ PO ₄ (10:1) | | |
| (6) 過マンガン酸カリウム | 0.1N KMnO ₄ | | (3) アニスアルデヒド anisaldehyde 0.5 ml + CH ₃ COOH 50 ml + conc. H ₂ SO ₄ 1 ml | | 糖類一般 100~110°C, 5~10分 |
| (7) リンモリブデン酸 | phosphomolybdic acid 5g/C ₂ H ₅ OH 100 ml | | (4) アンモニア性硝酸銀 (イ) 飽和 AgNO ₃ /H ₂ O 1 ml に (CH ₃) ₂ CO 20 ml を加え、析出 する AgNO ₃ が溶けるまで水を 加える | | 還元糖 |
| 地衣成分 | アニスアルデヒド-硫酸 anisaldehyde/CH ₃ COOH (0.5/5 ml) ま たは CH ₃ OH (0.5/8.5 ml) 液と conc. H ₂ SO ₄ 1 ml の混液 | 100°C, 10分 | (ロ) (a) 0.3% AgNO ₃ -CH ₃ OH (b) アンモニア飽和-CH ₃ OH (c) 7% Na-CH ₃ OH 用時 (a), (b), (c) を 5:1:2 に 混合 | | |
| リグナン | conc. H ₂ SO ₄ -CH ₃ COOH (1:3) | 100°C, 10分 | (5) バナジン酸 vanadic acid 2g + H ₂ O 5 ml/ + 50% H ₂ SO ₄ 50 ml | | 還元糖 110°C, 10分 |
| フラボン | Naturstoff 試液 A diphenyl boric acid β-aminoethylester (1% CH ₃ OH 液) UV 下 | α, γ-ピロン化 合物 | (6) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 4% TTC-CH ₃ OH + 1N NaOH- H ₂ O (1:1) | | 還元糖 110°C, 10分 |
| クマリン | (1) UV (2) 五塩化アンチモン (前出) | 100°C, 10分 | (7) ベンジジン-過ヨウ素酸ナトリウム | | 酸, 糖, 糖アル コール |
| クロモン | (1) UV (2) 三塩化アンチモン (前出) (3) 10% KOH/CH ₃ OH | 100°C, 10分 | (a) 0.1% NaIO ₄ -H ₂ O (b) benzidine 2.8 g + C ₂ H ₅ OH 80 ml + H ₂ O 70 ml + (CH ₃) ₂ CO 30 ml + 1N HCl 1.5 ml まず (a) を噴霧、次に (b) を噴霧 | | |
| ヒドロキノン | Millon 試液 (Hg 5g を発煙 HNO ₃ 10g に溶かし水 10 ml を加える) | | (8) <i>p</i> -ニトロアニリン-過ヨウ素酸 ナトリウム | | デスオキシ糖 |
| 脂質 | | | (a) 飽和 NaIO ₄ -H ₂ O + H ₂ O (1:2) (b) 1% <i>p</i> -nitroaniline-C ₂ H ₅ OH + conc. HCl (4:1) まず (a) を噴霧、10分後に (b) を 噴霧 | | |
| (複合脂質 も含む) | (1) 硫酸 (2) 重クロム酸カリウム-硫酸 conc. H ₂ SO ₄ に K ₂ Cr ₂ O ₇ を飽和 (3) I ₂ または I ₂ の 1% CH ₃ OH 液 (4) 2',7'-dichloro-fluorescein (0.2% C ₂ H ₅ OH 液) (5) Rhodamine B 0.05% C ₂ H ₅ OH 溶液 (6) Rhodamine 6G 0.05% C ₂ H ₅ OH 溶液 (7) リンモリブデン酸 5~20% C ₂ H ₅ OH 溶液 (8) ニンヒドリン (0.25% アセトン 溶液) (9) Dragendorff 試液 (a) 塩基性硝酸ビスマス 1.7 g + 20% CH ₃ COOH 100 ml (b) KI 40g + H ₂ O 100 ml 用時 (a) 20 ml (b) 5 ml を混じ H ₂ O 70 ml を加える (10) diphenylamine 10% diphenylamine C ₂ H ₅ OH 溶 液 20 ml + conc. HCl 100 ml + CH ₃ COOH 80 ml (11) Bial 試液 conc. HCl 40.7 ml + Orcin 0.1 g + 1% FeCl ₃ 液 1 ml. これに水を 加えて 50 ml にする (12) BTB 0.04 mg + 0.01N NaOH soln. 100 ml | リビド一般 リビド一般 リビド一般 リビド一般 リビド一般 中性脂肪 アミノ基を含む もの コリンを含むも の グリコリビド グリコリビド リビド一般 | アルカロイド (1) Dragendorff 試液 (Munier の 変法) ²¹⁾ | | |
| 糖類 | (1) アニリンフタレート | 還元糖 | | | |

| 化合物群 | 試液 | 備考 | 化合物群 | 試液 | 備考 |
|---------------------------|--|----------------------------|--|----|----------------------|
| | (イ) 塩基性硝酸ピスマス 17g+ 酒石酸 200g+H ₂ O 800ml | | (7) 20% SbCl ₃ /CHCl ₃ | | トリテルペン 100°C, 10分 |
| | (ロ) KI 160g+H ₂ O 400ml | | (8) 25% SbCl ₃ /CHCl ₃ | | " |
| | 用時(イ), (ロ) (1:1) の混液 50ml に酒石酸 100g, H ₂ O 500ml を加え る | | (9) 40% ケイタングステン酸/ C ₂ H ₅ OH | | " |
| | (2) 塩化白金-ヨウ化カリウム試液 10% H ₂ PtCl ₆ /H ₂ O 3ml+H ₂ O 97ml+6% KI-H ₂ O 100ml | | (10) 10% H ₂ SO ₄ | | " |
| | (3) 0.2% <i>p</i> -dimethylamino- benzaldehyde-HCl | バックカアルカ ロイドインド ール誘導体 | (11) pH 指示薬 (BTB, BCG) | | 酸性テルペン 100°C, 10分 |
| | (conc. HCl-H ₂ O 1:4) | | (イ) BTB 0.1g+0.2N NaOH 8ml+H ₂ O 250ml | | |
| | (4) 1% 硫酸セリウム/2N H ₂ SO ₄ | クラールアルカ ロイド | (ロ) BCG 0.04g+96% C ₂ H ₅ OH 100ml+0.1N NaOH 溶液 (青 変するまで加える) | | |
| ステロイド | (1) H ₂ SO ₄ 種々の濃度 | 100°C, 10分 | ビタミン (1) アルカリ性フェリシアン化ナトリ ウム試液 | | UV |
| | (2) conc. H ₂ SO ₄ -CH ₃ COOH | " | 1% フェリシアン化ナトリウム溶液 1.5ml+H ₂ O 20ml+15% NaOH 10ml | | |
| | (3) クロルスルホン酸-CH ₃ COOH | " | (2) アンモニア性硝酸銀試液 | | |
| | (4) 20% SbCl ₃ /CHCl ₃ | " | 0.1N AgNO ₃ +5N NH ₄ OH (1:1) | | |
| | (5) 25% SbCl ₃ /CHCl ₃ | " | (3) 25% SbCl ₃ /CHCl ₃ | | |
| | (6) 1% anisaldehyde+2% conc. H ₂ SO ₄ -CH ₃ COOH | 120°C, 10分 | (4) 20% SbCl ₃ /CHCl ₃ | | |
| | (7) 1% vanillin-50% H ₃ PO ₄ | " | (5) モリブデン酸アンモニウム-クエン 酸緩衝液 | | |
| | (8) 3% vanillin+0.5% conc. H ₂ SO ₄ /C ₂ H ₅ OH | " | (イ) 15% ammonium molybdate/ 1% NH ₄ OH | | |
| | (9) 過マンガン酸カリウム-硫酸 (前出) | | (ロ) 0.1N HCl 48.1ml+0.1N sodium citrate 51.9ml | | |
| | (10) トリクロル酢酸 | 100°C, 10分 | (イ) 15ml+(ロ) 10ml+conc. H ₂ SO ₄ 15 滴 | | |
| | (11) トリクロル酢酸-クロラミン | 120°C, 10分 | (6) 硝酸コバルト試液 | | |
| | (a) 3% chloramine/H ₂ O 1ml | | 1% Co(NO ₃) ₂ /C ₂ H ₅ OH | | |
| | (b) 25% trichloroacetic acid/ C ₂ H ₅ OH | | (7) 2,6-ジブロムキノンクロルイミド 試液 | | |
| | (a), (b) を (1:4) の割合に混合 | 糖類 (6) に同 じ | 0.4% 2,6-dibromoquinone- chlorimide/CH ₃ OH | | |
| | (12) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) | コレチコステロ イド | (8) 2,6-ジクロルキノンクロルイミド 試液 | | |
| | (13) Blue tetrazolium (BT) | | 1% 2,6-dichloroquinone- chlorimide/C ₂ H ₅ OH | | |
| | 0.5% メタノール性 BT 2ml+conc. NH ₄ OH 2ml 使用前に 6N NaOH 3ml を加える | | (9) <i>p</i> -ジメチルアミノベンズ アルデヒド試液 | | |
| | (14) リンモリブデン酸 5~10% C ₂ H ₅ OH 溶液 | 100°C, 10分 | <i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyde 1g +conc. HCl 50ml+C ₂ H ₅ OH 50ml | | |
| | (15) リンタングステン酸 10% C ₂ H ₅ OH 溶液 | " | (10) Emmerie-Engel 試液 | | |
| 強心配糖体 (ステロイド 試液は共通) | (1) Kedde 試液 | cardenolide | (イ) 0.5% α, α'-dipyridyl/C ₂ H ₅ OH | | |
| | (イ) 2% 3,5-dinitrobenzoic acid/ CH ₃ OH | | (ロ) 0.2% FeCl ₃ /C ₂ H ₅ OH | | |
| | (ロ) 1N KOH-H ₂ O 用時等量混合 | | 用時等量混合 | | |
| | (2) 硫酸-次亜塩素酸試液 2N H ₂ SO ₄ 10ml+10% 活性塩素 を含む NaClO·5H ₂ O/H ₂ O 3ml | | (11) Dragendorff 試液 (脂質に同じ) | | |
| | (3) 20% <i>p</i> -トルエンスルホン酸アル コール溶液 | 2-デオキシ糖 | (12) ニンヒドリン試液 (アミノ酸に同 じ) | | |
| | (4) バニリン-過塩素酸試液 | | (13) ヨウ素 (前出) | | |
| | (イ) 1% vanillin/C ₂ H ₅ OH | | (14) 塩化白金-ヨウ化カリウム試液 | | |
| | (ロ) 3% HClO ₄ /H ₂ O | | 10% H ₂ PtCl ₆ 溶液 3ml+H ₂ O 97ml+6% KI 溶液 100ml | | |
| | 用時等量混合 | | (15) 重クロム酸カリウム-硫酸 K ₂ Cr ₂ O ₇ 3g+H ₂ O 20ml+conc. H ₂ SO ₄ 10ml | | |
| テルペノイド | (1) 10% SbCl ₃ /CHCl ₃ | モノテルペン 100°C, 10分 | (16) リンモリブデン酸試液 | | |
| | (2) 10% SbCl ₃ /CHCl ₃ | " | phosphomolybdic acid 10g+ C ₂ H ₅ OH 100ml | | |
| | (3) クロルスルホン酸+95% 酢酸 (1:2) | " | | | |
| | (4) アニスアルデヒド+酢酸または conc. H ₂ SO ₄ (0.5:10) | セスキテルペン 100°C, 10分 | 抗生物質 (1) ニンヒドリン試液 (アミノ酸に同 じ) | | |
| | (5) conc. H ₂ SO ₄ | " | (2) 過マンガン酸カリウム-ブロム フェノールブルー | | |
| | (6) 0.5% KMnO ₄ | " | | | |

| 化合物群 | 試液 | 備考 | 化合物群 | 試液 | 備考 |
|-------|---|--|---------------|--|----|
| | 0.5% $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{O}$ を噴霧し、 5~10 分放置後 0.2% Bromphenol Blue/ H_2O 噴霧 | | 簡単な 有機化合物 | (1) ローダミン B Rhodamine B 0.5 g + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 100 ml | |
| | (3) ヨウ化アシド | ペニシリン | | (2) ベンジジン-過ヨウ素酸試液 (イ) 0.1% $\text{NaIO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (ロ) benzidine 2.8 g + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 80 ml + H_2O 70 ml + $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 30 ml + 1 N HCl 1.5 ml (イ) を噴霧、少時後 (ロ) を噴霧 | |
| | (4) 1N HCl | テトラサイクリン | アルコール | | |
| 有機リン剤 | (1) 0.1% 塩化パラジウム/dil. HCl (2) (イ) 5% Br_2/CCl_4 (ロ) 0.25% fluorescein in <i>N,N</i> - dimethylformamide/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 50 ml (ハ) AgNO_3 1.7 g + H_2O 5 ml + 2-phenoxyethanol 10 ml + $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 200 ml (イ), (ロ), (ハ) の順に噴霧した のち 7 分間 UV 照射 (3) I_2 (4) <i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -phenylene- diamine-HCl の Na-ethoxide 溶液 と UV との併用 0.5% <i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -phenylene- diamine-HCl/Na 1 g + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 100 ml | | アルデヒド、 ケトン | (1) (イ) 0.5% 2,4-dinitrophenyl- hydrazine-2V HCl (ロ) 2,4-dinitrophenyl- hydrazine 1 g/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 1 l + conc. HCl 10 ml (2) 10% リンモリブデン酸/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (3) <i>o</i> -dianisidine- CH_3COOH 飽和溶液 | |
| 有機塩素剤 | (1) 0.5% toluidine/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, UV (2) I_2 (3) 0.5% $\text{AgNO}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 噴霧, 100°C, 5 分後 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (1:1) 中に BTB 0.2%, AgNO_3 0.15% を溶かした 液を噴霧 | 100°C, 10分 | カルボン酸 | (1) pH 指示薬 (BCG, BPB, BCP, MR) (イ) BCG 0.04 g + 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 100 ml + 0.1N NaOH 溶液 (青 変するまで加える) (ロ) BPB 0.04 g + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 40 ml + 希アンモニア水数滴 (変 色するまで加える) | |
| 錯体 | (1) NaOH 液噴霧後、0.5% ルベア ン酸/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ およびアンモニア水 噴霧 (2) 2% 硫酸第一鉄溶液 | ニトロアンミン コバルト(III) 系錯塩 シアノ鉄系錯塩 | アミン | (1) ニンヒドリン試液 (アミノ酸に同 じ) (2) $\text{I}_2/0.1\%$ CHCl_3 (3) 1% α -naphthylamine/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (4) Ehrlich 試薬 (5) 3% ジメチルアミノベンズアルデ ヒド希硫酸 (10%), 芳香族一般 アミン | |
| | | | オレフィン | (1) 20% diphenylcarbazide/ CH_3OH | |

4 緩衝液を利用する薄層クロマトグラフィー

multibuffered ペーパークロマトグラフィーは Swain
によりはじめてクマリン誘導体の分離に用いられ、さら

に Reppel²²⁾ によってヒドロキシクマリン誘導体の分離
が行なわれた。この方法は一定の間隔に pH の異なる
緩衝液を横に帯状につけ、エーテルで展開する。極性の
異なる各化合物はそれぞれのバンドのところに止まる。

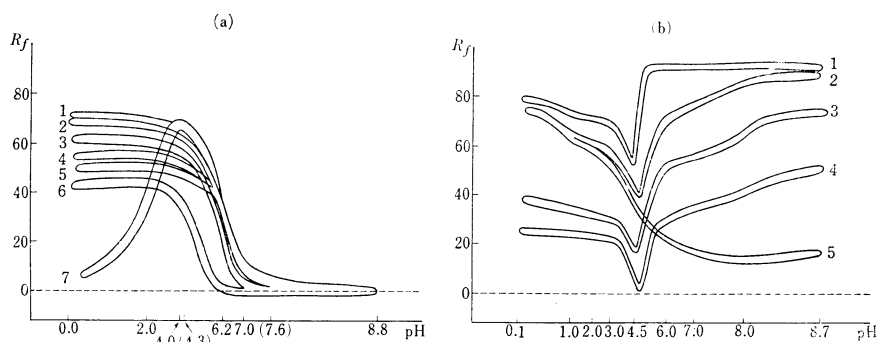


図 7 pH-T-gradient TLC

(a)——1: インドール-3-酪酸, 2: インドール-3-プロピオン酸, 3: インドール-3-酢酸, 4: インドール-3-アクリル酸, 5: インドール-3-カルボン酸, 6: インドール-3-乳酸, 展開溶媒: クロロホルム-メタノール (9:1), 発色試薬: *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド-塩酸; (b)——1: パパベリン, 2: テバイン, 3: コデイン, 4: モルヒネ, 5: ナルセイン, 展開溶媒: クロロホルム-メタノール (75:25), 発色試薬: アルカリ領域に 1N 硫酸を噴霧後乾燥してヨウ化白金カリウム試液を噴霧

また最近 Stahl ら²³⁾によって報告された方法は pH-T-gradient (traverse gradient) 薄層クロマトグラフィーと呼ばれ、これは縦軸に沿って pH 領域を変えてゆくものである。薄層につけられた pH 領域に pK 値を有する化合物は、それぞれ特徴のある曲線を生ずるので微量の未知化合物の同定にも応用される。図 7 にその例を示す。

5 薄層クロマトグラフィーの 有機分析への応用例

有機化合物は種類が多く、それぞれの化合物についての応用例は非常に膨大で、ここで紹介しきれものではない。各種の成書¹⁴⁾を参照すれば有用な応用例が数多く収載されており、なおその後も発表される論文の数は増加の一途をたどっているので文献集²⁴⁾などを参照されると思う。ペプチド・たん白質関係の分野では、固定相にセファデックスを使用して TLC を行なうが、原理的にはカラム中におけるゲルろ過法と同じである。

定量法については前回の無機化合物の分析の場合とだいたい同様な方法がとられている。

文 献

- 1) M. Tswett : *Ber. deutsch. bot. Ges.*, **24**, 316 (1906).
- 2) R. Kuhn, E. Lederer : *ibid.*, **64**, 1349 (1931).
- 3) R. Kuhn, A. Winterstein, E. Lederer : *Z. physiol. Chem.*, **197**, 141 (1931).
- 4) A. J. P. Martin, R. L. M. Synge : *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).
- 5) R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin : *ibid.*, **38**, 224 (1944).
- 6) J. G. Kirchner, J. M. Miller, G. J. Keller : *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
- 7) J. E. Meinhard, N. F. Hall : *ibid.*, **21**, 185 (1949).
- 8) R. H. Reitsem : *ibid.*, **26**, 960 (1954).
- 9) J. M. Miller, J. G. Kirchner : *ibid.*, **26**, 2002 (1954).
- 10) E. Stahl, G. Schröter, G. Kraft, R. Penz : *Die Pharmazie*, **11**, 633 (1956).
- 11) N. A. Izmailov, M. S. Schraiber : *Farmasiya*, **3**, 1 (1938).
- 12) M. O'L. Crowe : *Anal. Chem.*, **13**, 845 (1941).
- 13) M. Mottier, M. Potterat : *Anal. Chim. Acta*, **13**, 46 (1955).
- 14) 石川正幸, 原 昭二, 古谷 力, 中沢泰男編 : “薄層クロマトグラフィー”, 第 2 版, (1963), (南山堂).
原 昭二, 田中 治, 滝谷昭司編 : “薄層クロマトグラフィー”, 第 1, 2 集 (化学の領域増刊, 59, 64号), (1964), (南江堂).
日本化学会編 : “実験化学講座”, 続 2 (分離と精製), (1967), (丸善).
E. Stahl, Ed. : “Thin-Layer Chromatography”, 2nd Ed., (1969), (Springer-Verlag, Berlin).
K. Macek, I. M. Hais, Ed. : “Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography”, (1965), (Elsevier, Amsterdam).
- 15) 小熊幸一, 黒田六郎 : 本誌, **19**, 615 (1970).
- 16) 原 昭二 : 第 18 回日本薬学会年会講演 (1963年 11月).
- 17) C. G. Honegger : *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1409 (1962).
- 18) M. K. Seikel, M. A. Millett, J. F. Saeman : *J. Chromatog.*, **15**, 115 (1964).
- 19) S. Hara, K. Mibe : *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1036 (1967).
- 20) B. G. Johansson, L. Rymo : *Acta Chem. Scand.*, **16**, 2067 (1962).
- 21) R. Munier : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1225 (1953).
- 22) L. Reppel : *Die Pharmazie*, **12**, 654 (1957).
- 23) E. Stahl, E. Dumont : *J. Chromatog. Science*, **7**, 517 (1969).
- 24) *Journal of Chromatography*, Elsevier Publ. Co., 月刊誌各号の末尾.