

1 目的

カラムクロマトグラフィーを用いて、混合物から目的物質の単離を行う。

2 原理

カラムクロマトグラフィーは、移動相に含まれるいくつかの化合物と固定相との相互作用による流出速度の差によって、物質を単離するという分離方法である。移動相との相互作用が強ければ物質は移動相と共に速く流れ、固定相との相互作用が強ければ物質は溜まりやすくなり、ゆっくりと流出していく。

分子吸光係数 ε は、ランベルトベールの法則を用いて求めることができる。

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A は吸光度、b はセル長、c は溶液のモル濃度である。

3 実験操作

3.1 試薬

- | | |
|---------|----------|
| ・粉末乾燥人参 | ・ジクロロメタン |
| ・シリカゲル | ・海砂 |
| ・ヘキサン | ・エーテル |

3.2 使用器具

- | | |
|---------------|----------------|
| ・抽出用パック | ・50ml ビーカー |
| ・200ml ビーカー | ・ガラス棒 |
| ・ガラスロート | ・ろ紙 |
| ・樹脂製粉末ロート | ・クロマト菅 |
| ・200ml 三角フラスコ | ・50ml 三角フラスコ |
| ・駒込ピペット | ・パスツールピペット |
| ・10ml メスシリンダー | ・100ml ナス型フラスコ |
| ・10ml ナス型フラスコ | ・フラスコ置き |
| ・カットリング | ・ムッフ |
| ・綿 | ・クランプ |
| ・25ml メスフラスコ | ・石英セル |

3.3 抽出および分離・分取操作

- ①乾燥粉末人参約 20mg を秤とり、抽出用パックに入れて口をし、50ml ビーカーに入れた。
- ②これにジクロロメタン約 20ml を入れ、3 分程度ガラス棒で揉みだすようによく抽出した。
- ③抽出液は、ガラスロートと折ってひだを付けたろ紙を用いて濾過した。ろ液は 100ml ナス型フラスコで受けた。
- ④操作②、③をもう一度行い、抽出液約 40ml を得た。
- ⑤得られたろ液をロータリーエバポレーターで溶媒を減圧除去した。残渣は 100ml ナス型フラスコの内壁を洗うように 2ml 程度のヘキサンで溶解した。これを 100ml ナス型フラスコにパスツールピペットを用いて移した。さらに、1ml 程度のヘキサンで同様のことを 3 回繰り返した。
- ⑥ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧除去し、得られた抽出物を精密天秤で測定した。
- ⑦測定後、ナス型フラスコの内壁を洗うように、できるだけ少量のヘキサンで溶解させた。
- ⑧長いガラス棒を用いてクロマト菅に栓をし、樹脂製の粉末ロートを使って、その上に海砂を 5 mm 程度載のせた。
- ⑨200ml ビーカーにシリカゲル約 30g 入れ、1% エーテルを含むヘキサン溶液(以下展開溶媒と呼ぶ)を適量加え、シリカゲルを展開溶媒に馴染ませた。
- ⑩50ml 三角フラスコを受器としてセットした。シリカゲルと展開溶媒の混合物をクロマト菅に静かに注ぎ込んだ。
- ⑪コックの先から溶媒が出てきたら、展開溶媒でビーカー内のシリカゲルを洗いこみつつカラムトップをフラットにした。
- ⑫シリカゲルを十分に湿潤させたのち、展開溶媒をシリカゲルの上に 5 mm 程度残した状態まで滴下させ、コックを閉じた。
- ⑬操作⑦で準備した抽出物のヘキサン溶液を、パスツールピペットを用いてシリカゲルの上にある展開溶媒に静かに加えた。
- ⑭コックを用いて溶媒を落とし、シリカゲルが乾く直前でコックを閉じた。
- ⑮ナス型フラスコの内壁を洗うように、できるだけ少量のヘキサンを加え、操作⑬、⑭を抽出物がなくなるまで繰り返し、抽出物を完全にシリカゲルにのせる。
- ⑯海砂を 5 mm 程度のせ、回収した展開溶媒を静かに注いだ。
- ⑰空の 50ml 三角フラスコを受器にセットし、コックを開き滴下を始めた。展開された主たる成分を注意して分取した。
- ⑱分取した主成分を適量 100ml ナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧除去した。濃縮が終わったら、操作⑤、⑥と同様に 100ml ナス型フラスコに残渣を移し、測定した。抽出物とカラム分取した精製物の重量を比較した。

3.4 スペクトルの測定の操作

- ①精製物を約 2ml のヘキサンを加えて溶解し、パスツールピペットを用いて 25ml メスフラスコに移した。フラスコ内のすべての精製物を移せたら、標線までヘキサンでメスアップした。さらにその溶液を 50ml ビーカーに約 10ml 程度移し、そこから $500\mu\text{L}$ をマイクロピペットを用いて新しいメスフラスコに移し、ヘキサンでメスアップし、二段階希釈を行った。
- ②これを適量測定セル(セル長 1.0cm)に移し、吸光度を測定した。
- ③スペクトルの吸収極大での吸光度を読み取り、文献値の分子吸光係数 ε から溶媒濃度を計算し、カロテンの含有量を求めた。

4 実験結果

得られた抽出物と精製物の重さは以下の表にまとめた。

	抽出物	精製物
100ml ナス型フラスコの重量(g)	24.792	25.173
一連の操作後の重量(g)	24.827	25.174
得られたものの重量(g)	0.035	0.001

スペクトルの測定結果はこのレポートの末尾に添付した。これによると、吸光極大は、No.2 の 446nm で、強度 $A = 0.0340047$ 、No.3 の 472nm で強度 $A = 0.0295164$ である。

スペクトル測定した際のカロテンのモル濃度を求める。カロテンの分子量は 536.87g/mol であり、得られた精製量は $1.0 \times 10^{-3}\text{g}$ であるので、その物質量は、

$$\frac{1.0 \times 10^{-3}}{536.87} \cong 1.863 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

である。メスアップをした一回目の溶液のモル濃度は、

$$\frac{1.863 \times 10^{-6}}{25 \times 10^{-3}} \cong 7.452 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

である。メスアップ二回目の溶液のモル濃度は、20 倍希釈をしているので、

$$\frac{7.452 \times 10^{-5}}{20} \cong 3.726 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

と求めることができた。

これと、原理で述べたランベルトベールの法則より、分子吸光係数 ε の実験値は、

$$\varepsilon = \frac{0.0340047}{1.0 \times 3.726 \times 10^{-6}} \cong 9.126 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$$

と算出できた。

参考文献より、ヘキサン溶媒中における分子吸光係数 ε は、 α カロテンは 446nm にて $\varepsilon = 146\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 β カロテンは 451nm にて $\varepsilon = 135\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 γ カロテンは 462nm にて $\varepsilon = 148\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とあった。また、カロテンの中でも β カロテンは通常 3 つのバンド帯で構成されるそうなので、実験で観測したのは β カロテンであるにとらえた。これより、文献値によるカロテンの濃度は、

$$\frac{0.0295164}{1.0 \times 135 \times 10^3} \cong 2.186 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

と求められた。

文献値によって算出したカロテンの濃度より、その精製物の理論値は、

$$2.186 \times 10^{-7} \times 536.87 \times 25 \times 10^{-3} \times 500 = 1.467 \times 10^{-3} \text{ g}$$

と求められた。これより、最初の乾燥人参 20 g よりカロテンの含有率は、

$$\frac{1.467 \times 10^{-3}}{20} \times 100 \cong 7.34 \times 10^{-3} \%$$

である。

5 考察

野菜の中で、特に人参は抗酸化作用のあるカロテンが多く含まれており、皮ごと調理して食べると健康に良いという話を聞いたことがあったのだが、その含有量は想像よりも遥かに小さかった。

カロテンの精製した量は、精密天秤での測定範囲を考慮すると、結果的に実験値と理論値は一致した。しかし、カラムクロマトグラフィーの作業の際、シリカゲルを完全にフラットにすることができなかったため、カロテンの抽出物の色素が一部カラムの中に残っていた。つまり、シリカゲルをフラットにでき、完全にカラムクロマトグラフィーの作業が出来ていたならば、実験値の方が理論値よりも大きくなっていたはずである。この原因として、カラムクロマトグラフィーだけではカロテンを単離することはできず、他の不純物も一緒に精製してしまっていたことが考えられる。具体的に、カロテン以外にも抽出してしまった物質として、全ての生物の構成要素である細胞にある、リン脂質などの膜タンパク質が考えられる。酸に弱い物質は、クロマトグラフィーの際にシリカゲルによって分解されるので、酸に強く塩基に弱いような物質が残っているはずである。よって、このような不純物も抽出しな

いようにするためには、一度塩基にもさらした方がいいのではないか、と考えた。

カロテンの化学構造は以下のようにになっている。

カロテンは非常に多くの生理活性を持っている。植物においては、光損害防御、活性酸素除去、ラジカル除去、ホルモン前駆体、花卉や果実の発色、電子移動などに携わる。

その光合成生物におけるカロテンの生合成経路は、イソペンテニルピロリン酸が重合したものに環構造が加わることによる。

類似化合物は非常に多く存在する。下に例を挙げた。

6 参考文献・HP

・『カロテノイド ―その多様性と生活活性―』 編纂・高市真一他 発行・裳華房

化学構造、生理活性、生合成、代謝、類似化合物
 ε の比較