

カラムクロマトグラフィーで色素を分離しよう

応用化学科 うえだ いくお
植田 郁生

【はじめに】

クロマトグラフィーは、今日最も一般的に使用されている分析法の一つです。クロマトグラフィーでは、試料分子は移動相によって固定相の間を移動するが、その移動速度は試料分子と移動相および固定相との相互作用に依存します。試料が混合物の場合、各成分分子はそれぞれ相互作用の程度に依存した異なる速度で移動するので、移動速度の差を利用して混合物を「分離」することができます。

移動相には気体（ガスクロマトグラフィー：GC）または液体（液体クロマトグラフィー：LC）が使用される。GCでは、主に試料の揮発性によって、そしてLCでは、試料分子の極性、疎水性、大きさ、形状、イオン性などによって分離することができます。GCおよびLCともに、環境試料、生体試料、食品や飲料品などの分析に幅広く使用されています。

ここでは、分離の進行状態を目で見ることができ操作が容易であり、LCの一つであるカラムクロマトグラフィーを体験し、クロマトグラフィーの原理と特徴を理解することを目的とします。

【実験概要】

本実験では固定相（充填剤）としてシリカゲルを使用します。シリカゲルの表面は極性が高いため、水酸基などをもつ極性の高い分子は強く吸着され、移動速度が遅くなります。一方、極性の弱い分子はあまり強く吸着されないため、早く移動します。また、固定相の吸着能力だけではなく、移動相の極性も重要な分離のパラメーターです。移動相の極性が高くなると、移動相の固定相への吸着が強くなり、試料分子の固定相への吸着と競合し始めます。その結果、試料分子は固定相との相互作用が弱くなり移動速度が速くなります。そのため、移動相組成を変えることによって試料分子の移動速度が変化します。

試料の分離はカラム効率によって大きく影響されます。充填剤の粒子径が小さいほどカラム効率は高くなりますが、移動相を流すために必要な圧力が高くなります。また、カラム効率を高くするには、充填剤を均一に充填することが重要です。

本実験では、抹茶から抽出した植物色素を試料として用います。この植物色素試料をシリカゲルカラムに供して、移動相を流すことで、試料中に含まれる分子を分離します。

【実験方法】

色素の抽出

- ① 粉末の抹茶 3.0 gを50 mLのビーカーにはかりとる。
- ② ビーカーにアセトン20 mLを加え、ガラス棒でよく攪拌して、抹茶の色素をアセトンに抽出する。
- ③ アセトン溶液をひだ付きろしでろ過し、ろ過後の溶液を約2 mLまで窒素の噴き付けにより濃縮し、試料溶液とする。

カラムクロマトグラフィーの準備

- ① シリカゲル（ワコージルC200） 5 gに対し、移動相溶媒（ヘキサン/2-プロパノール = 100/4）を10 mL加え、スラリーとする。
- ② カラム（ガラス管）の中程までパスツールピペットを用いて移動相を満たしておく。
- ③ スラリーを激しくかきまぜ、パスツールピペットを用いてカラムに注ぐ。ゲルが沈降して白い柱ができはじめたら、スラリーを継ぎ足す。ゲルの長さは約10 cmにする。ゲルが十分に充填されたら、余分な溶媒をパスツールピペットで吸い出してもよい。
（これ以後の操作では、ゲル表面が露出しないようにする。また、パスツールピペットで移動相を加えるとき、ガラス内壁を伝わらせて溶媒をそそぎ、表面を乱さないように注意する。）
- ④ パスツールピペットを用いて、少量の移動相で内壁のシリカゲルを洗い落とす。

色素の分離

- ① カラムのコックを開けて移動相を流し、移動相の液面がシリカゲルと同じとなったら、パスツールピペットを用いて色素試料溶液を静かにシリカゲル上に滴下する。その際、シリカゲルの上面に均等に滴下する（5滴ほど）。
- ② パスツールピペットを用いて少量の移動相をカラム上部に注入して壁面の色素を静かに洗い落とす。使う溶媒は少量にとどめ、シリカゲル面上に5 mm以上たまるないようにする。この操作を2回繰り返す。
- ③ パスツールピペットを用いて、移動相をカラム上端から内壁を伝わらせて注入し、カ

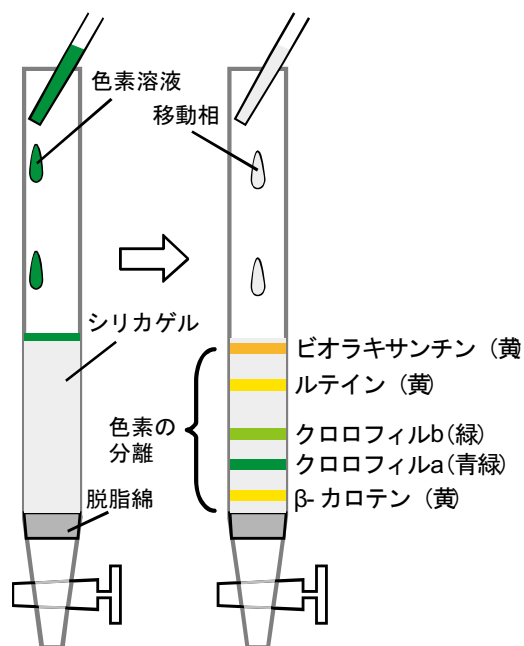


図1 色素の分離.

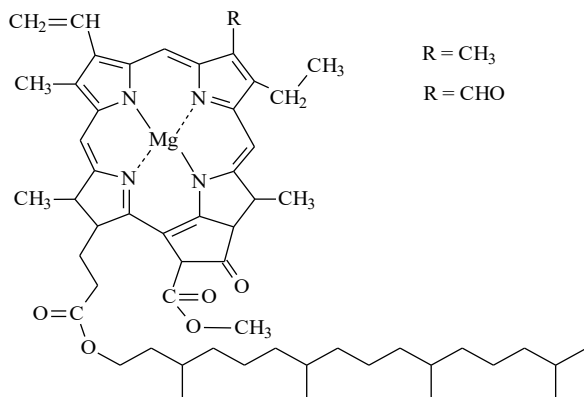
ラム上端まで溶媒を満たす。

- ④ 色素が徐々に分離してくる(図1)。液面が管の上端からあまり下がらないよう、パストゥールピペットでこまめに移動相を補充しながら分離の進行状況を観察する。分離成分ごとにスクリー管に集めて色の違いを観察する。(植物色素成分は図1の順に溶出する。)

【参考】

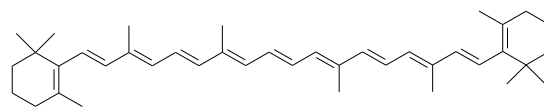
- ① 今回、固定相として用いたシリカゲルは、その表面の極性が高いので、水酸基をもつ、極性の高い分子(ルテイン、ネオキササンチン、ビオラキサンチンなど)と強く相互作用するが、水酸基のない、極性の弱い分子(β -カロテン)とはほとんど相互作用しない(図2)。そのため、ネオキササンチンなどは移動速度が遅く、 β -カロテンは移動速度が速くなる。
- ② 植物色素は光を吸収して電子を励起する。通常はこの電子のもつエネルギーは光合成に関する様々な反応に使用される。しかし、抽出された植物色素はエネルギーを蛍光として放出する。

クロロフィルa : R=CH₃
クロロフィルb : R=CHO

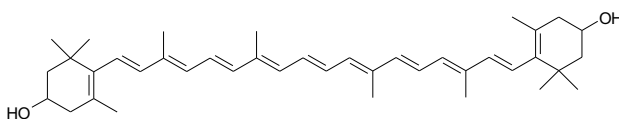


R = CH₃
R = CHO

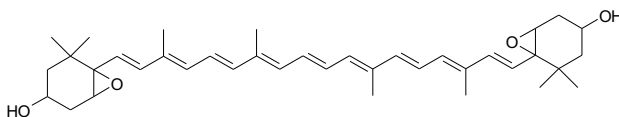
β -カロテン



ルテイン



ビオラキサンチン



ネオキササンチン

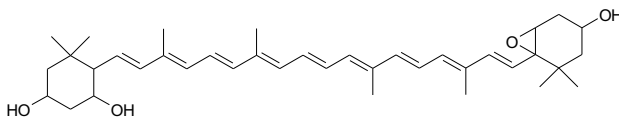


図2 植物色素の化学構造.