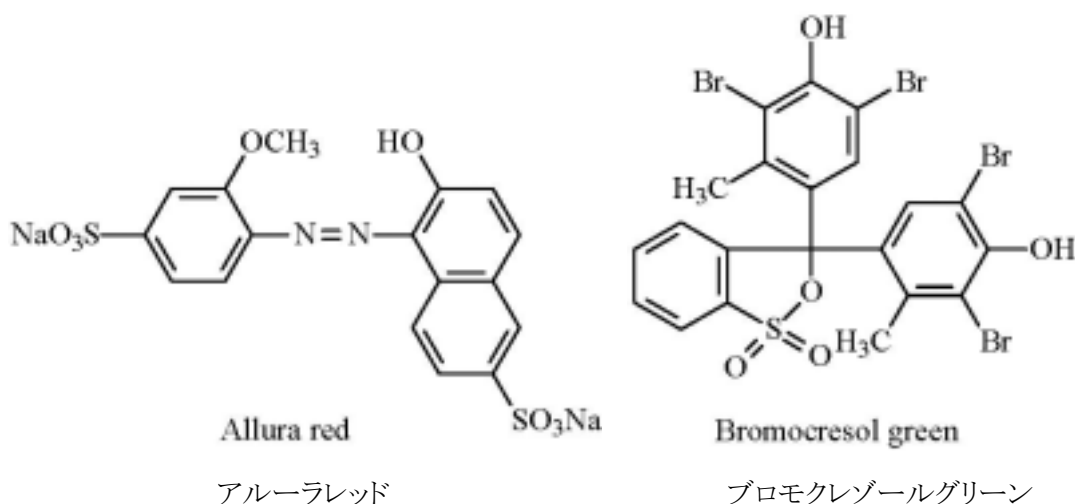


問題34: カラムクロマトグラフィーと分光光度法による色素の分離と定量

はじめに

この実験では、塩基型のアルーラレッド($C_{17}H_{12}N_2O_8S_2Na_2$, ARと略記)とブロモクレゾールグリーン($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$, BCGと略記)を混合した少量の液体未知試料を受け取る。パスツールピペットにシカゲルを詰めて作った小さなシリカゲルカラムに、未知試料の一部を入れる。表1に挙げた溶媒を使いながら段階的に溶離させて、色素を分離する。その際、色素を最もよく分離できると期待される二つの溶離液を選ぶ。引き続いて定められた体積に試料を希釈し、可視分光光度法により定量する。全体の実験を構成するそれぞれの要素、すなわちカラムの作製、分離、検量線および未知試料の分析は、定量的な連続希釈法、分光光度計の操作法および色素の分析波長の選定法を知っていれば、容易に行なうことができる。



物質

試薬	濃度	R表記	S表記
アルーラレッド	固体		
ブロモクレゾールグリーン	固体		22-24/25
塩酸	重量濃度(HClとして) 35%	23-34-37	26-45
トリエチルアミン		11-20/21/2-35	3-16-26-29-36/37/39-45
メタノール		11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
酢酸エチル		11-36-66-67	16-26-33
シリカゲル	固体		22-24/25

器具

可視分光光度計, 分析天秤, セル(光路長10 mm), 10 mLメスフラスコ12 本, 50 mLメスフラスコ2本, 50 mLビーカー2個, 2 mLパスツールピペット3本, 100 μ Lマイクロピペット1本, ピペットフィルター

操作1:色素原液の調製

これらの色素溶液は, 長時間たつと分解しやすい. そのため, 実験の直前に色素溶液を作らなければならない.

1. ブロモクレゾールグリーン. 正確に秤量した試料(300 mg)を50 mLメスフラスコ中で酢酸エチルに溶解し, これに紫色の塩基形となるよう十分な量のトリエチルアミンを加える.
2. アルーラレッド. 正確に秤量した試料(およそ100 mg)を50 mLメスフラスコ中で約30 mLのメタノールに溶解し, 色素が完全に溶解するまでトリエチルアミンを1滴ずつ加える. 続いてメタノールを標線まで加えて混合物を希釈する. 注意:アルーラレッドは次のようにして, 予め精製しなければならない. ARのナトリウム塩をメタノールに溶解し, 続いてろ過する. この溶液に, 過剰の濃塩酸を加える. およそ30 分後に, 生じたH⁺型の結晶をろ別する.

操作2:色素標準溶液の調製

それぞれの色素について, 原液を作るときに用いたものと同じ溶媒を使って原液を10 mLメスフラスコ中で希釈して5つの標準溶液を調製する. AR標準溶液については, 色素が酸型となるように3-4滴の濃塩酸を加える. 標準溶液の濃度は, 原液の濃度の1/10から9/10の範囲にななければならない.

操作3:色素の検量線の作製

それぞれの色素について, ppmで表した濃度に対する吸収極大での吸光度を使って, 検量線を作成する.

操作4:クロマトグラフカラムの作製

2 mLのパスツールピペットのくびれの部分にグラスウール(もしくは脱脂綿)の小さな栓を詰めて, クロマトグラフカラムを作る. 酢酸エチルでかゆ状にしたシリカゲル(45/70メッシュ)をピペットに加え, 4-5 cmのシリカゲル充填カラムとする.

操作5:カラムクロマトグラフィーと定量

1. 40 μ Lの未知液体をカラムに移す.

2. 表1から選んだ溶離液の数滴を使ってカラムの壁を洗い流し、溶離液をカラムに通す。溶出液を2〜3滴のトリエチルアミンが入った10 mLメスフラスコに集める。
3. 表1から選んだ2番目の溶離液をカラムに通し、3〜4滴の濃塩酸が入った別の10 mLメスフラスコに溶出液を集める。不純物の小さな帯が、カラムの最上部に残ることがある。
4. 塩基型の紫色をした最初のフラクション(分画)を最初の溶離液で希釈して定容する。
5. 酸型の赤色をした2番目のフラクション(分画)を2番目の溶離液で希釈して定容する。
6. 各色素についての検量線からそれぞれの試料の濃度を求め、未知試料中の各色素の量(mg)を求めよ。

表34-1. 候補となる溶離液系

溶離液番号	溶離液 第1セット	溶離液 第2セット
1	酢酸エチル	メタノール
2	メタノール	酢酸エチル
3	酢酸エチル-塩酸 ^a (200:1 v/v)*	メタノール-塩酸 (200:1 v/v)*
4	酢酸エチル-TEA ^{**} (200:1 v/v)	メタノール-TEA (200:1 v/v)*
5	メタノール-塩酸 (200:1 v/v)	酢酸エチル-塩酸 (200:1 v/v)*
6	メタノール-TEA (200:1 v/v)	酢酸エチル-TEA (200:1 v/v)*

a. 濃塩酸

* (訳者注: 体積比) ** (訳者注: トリエチルアミン)

問い

34-1. 試料中のARとBCGのppmで表した濃度はいくらか。

34-2. 分離は順相液体クロマトグラフィー(LC)モード^{*}で行われていることに留意せよ。色素の構造を考慮に入れると、最良の結果を得るためには、どちらの色素を初めに溶離させるとよいか。最初に溶出してくる色素のために、どの溶離液を使うとよいか。説明せよ。

* (訳者注: 順相液体クロマトグラフィー。極性と非極性の化合物があるとき、非極性の化合物が移動相により分配され、極性の化合物が固定相により分配されて分離される液体クロマトグラフィーのモード)

34-3. 2番目に溶出するのは、どちらの色素か。2番目の色素を溶離するために、どの溶離液を使えばよいか。説明せよ。