

Title	ペーパークロマトグラフィーにおけるRfの意味
Sub Title	What the Rf means in paper chromatography
Author	小島, りか (Obata, Rika) 大場, 茂 (Oba, Shigeru)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2016
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of natural science). No.60 (2016. 9) ,p.7- 15
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	研究ノート
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20160930-0007

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ペーパークロマトグラフィーにおける R_f の意味

小島りか・大場 茂

What the R_f means in Paper Chromatography

Rika OBATA and Shigeru OHBA

概 要

ペーパークロマトグラフィーは、化学実験における分析分野のテーマの1つである。その展開の結果を表わす数値が R_f である。この「 R_f 値」は化学用語として確立しているものの、理論的な背景や記号の由来はあまり知られていない。そこで本稿では、 R_f の意味について文献を調べてまとめた。歴史的には、混ざり合わない2液間で連続的に溶質が分配されると仮定して、カラムクロマトグラフ法における R 値が初めに定義された。これは、カラムから流れ出る溶媒の流速に対する、溶質の移動速度の比である。ペーパークロマトグラフ法については実用上の都合から定義を少し修正して、移動相の移動速度に対する溶質の移動速度の比とし、記号も区別するために R_f とすることが提案され、この表記が現在でも使用されている。なお、略号 R_f はかつて rate of flow とよばれていたが、実際には移動率と直接対応するわけではないため、最近では retardation factor などへの読み変えが行なわれている。

1. はじめに

化学において化合物の合成を行なう際に、混合物を分離し精製する必要がある。また、どのような物質が混ざっているか分析したい場合もある。それを簡便に行なうための非常に有効な方法の1つが、クロマトグラフ法である。これは紙やシリカなどの固定相に混合物を付着させ、その表面に溶媒などの移動相を流すことで、固定相と移動相に対する物質の親和性のちがいに

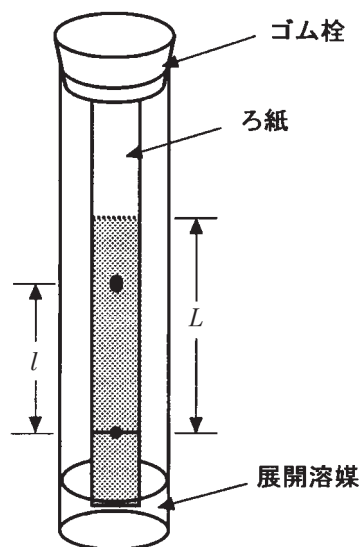


図1. ペーパークロマトでの展開の様子

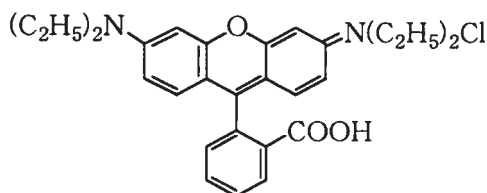
より移動速度が異なるため、混合物を分離させることができる。ペーパークロマトグラフ法では、展開した結果を表わすために R_f 値、つまり L (原点から溶媒が浸み込んだ先端までの距離) に対する l (原点からその物質のスポットの中心までの距離) の比を求める (図1)。

$$R_f = l / L \quad (1)$$

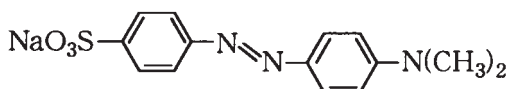
この R_f は、元来は移動率 (rate of flow) を表わしている^{1,2)}。しかし、その意味はあまり知られていない。また現状では、記号が何に由来するかもあいまいとなっている。そこで、本稿ではクロマトグラフ法に関する理論を紹介する。また、記号 R_f の読み変えの現状についても述べる。

2. 実験テーマの内容

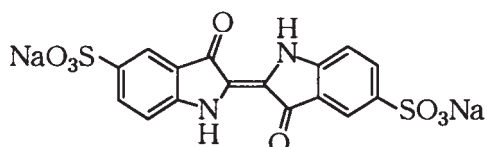
慶應義塾大学日吉キャンパスの文系学生を対象とする化学実験において、ペーパークロマトグラフィーの実験テーマが1960年代から行なわれていた。それは、金属イオン (Ag^+ , Hg_2^{2+} , Pb^{2+}) をブタノール/ピリジン/水の混合溶媒で短冊状ろ紙の上で展開し、硫化水素を吹きかけて黒色化して検出するという内容であった³⁾。しかし、環境保護の立場から、重金属化合物の取り扱いには注意を要する。そこで他大学で行なわれている実験⁴⁾を参考にして、2001年に分析対象を金属イオンから有機色素 (ローダミンB, メチルオレンジ, インジゴカルミン) へ変更した (図2)。これによって、展開の途中で混合色素が徐々に分かれていく様子をリアルタイムで見られるようになり、学生にとってわかりやすくなった。展開溶媒として、水とメ



ローダミンB(鮮紅色)



メチルオレンジ(橙色)



インジゴカルミン(青色)

図2. 分析対象の色素3種類

タノールの混合溶媒を用いるが、この混合比を変えると展開の順番が逆転する。種々の混合比を試行して検討した結果、スポットの分離がいちばん良くなる比率(水:メタノール=1:3)を用いることにした。また、溶媒の混合比がちがう場合を比較するために、水:メタノール=3:1の条件でも実験することにした。すなわち、水とメタノールの混合比が異なる2本のクロマト管を2人一組で使用し、混合色素の展開結果を考察する。水の比率が多いほうは色素の分離はやや不完全となるが、展開溶媒の条件を変えると結果が劇的に変わることは少なくともはっきりとわかる。

3. クロマトグラフ法

3-1. 相互作用や形状などにもとづく分類

クロマトグラフィーは、2相間における物質の分配を連続的に行うことにより、物質を分ける操作である。2相のうち的一方は、位置が固定されているので固定相(stationary phase)といい、その一端に混合物を添加する。それに対して、接触させながら位置を連続的に動かすほうを移動相(mobileあるいはmoving phase)とよぶ。物質と固定相との相互作用のちがいで、吸着型と分配型(固体表面に付着した別の溶媒が固定相としてはたらく)に大きく分かれる。また、固定相の材質や形状にもとづいて、ペーパークロマトグラフ法(短冊状のろ紙)、カラムクロマトグラフ法(シリカなどの粉末をガラス管に詰めたもの)、薄層クロマトグラフ

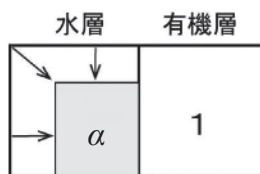


図3. 溶質の分配率 α 。分配により有機層中に比べて水層中の溶質の濃度が低い場合、水層の体積が見掛け上縮むため分配比が下がるとみなせる。

法（粉末をガラス板などの表面に薄く付着させたもの）、イオン交換クロマトグラフ法（イオン交換樹脂）などによぶ。その一方で、移動相のちがいを強調した名称であるが、ガスクロマトグラフ法や高速液体クロマトグラフ法という機器分析法も発達している⁵⁾。

3-2. 分配

混ざらない2種類の溶媒（体積比1:1）に対してある物質を加えて溶かしたとき、十分に時間が経過した平衡後の各溶媒中の物質の質量は、溶解度のちがいに応じて一定の比率となる。これを分配係数という。イメージしやすいように、典型例として一方を水層とし、他方を有機層とする。そして、分配率を次のように定義する。

$$\alpha = (\text{水層中の溶質の濃度}) / (\text{有機層中の溶質の濃度}) \quad (2)$$

体積が異なる2液の間の分配を考える際に、計算を単純化して分配の割合を体積比と同じにするために、水層の体積が見掛け上 α 倍であるとみなす。すなわち、有機溶媒に対して親和性の高い化合物の場合 $\alpha < 1$ であり、水層の体積が見掛け上縮んでいるため分配の比率が下がると考えればよい（図3）。

3-3. 移動率

まず、カラムクロマト法についての理論的な取り扱いを述べる。具体的な実験条件としては、コック付きのガラス管にシリカを入れ、それに吸着している水を固定相とし、有機溶媒で展開する場合を想定すると理解しやすい（図4）。カラム全体に有機溶媒を浸み込ませたのち、分離させたい混合物をカラムの上端に入れて少し浸み込ませ、それにさらに有機溶媒を十分に加えて下のコックから有機溶媒を徐々に流出させる。水に比べて有機溶媒に親和性が高い化合物ほど、そのバンドは速く移動する。その原理を考えるために理想化したモデルとして、固定相も移動相も小さい板（プレート）が連続的につながったものとし、そして移動相の一定体積 δv が1段ずつずれながら先に進み、固定相との分配をくり返していくと考える（図5）。ただし、取り扱いを単純化するために、隣の板への拡散はないものと仮定する。カラム方向の板の長さを h とし、固定相と移動相の断面積をそれぞれ A_S 、 A_L とする。また、固定相を保持している材質（クロマト管中のシリカ）の断面積を A_I とすると、これらの合計はカラムの全断面積（つ

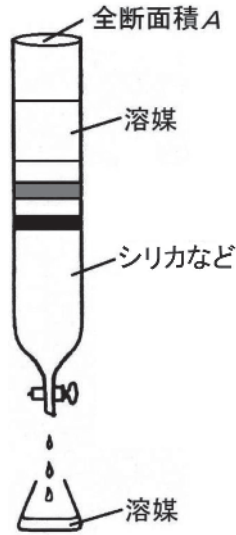


図4. カラムクロマトでの展開の様子

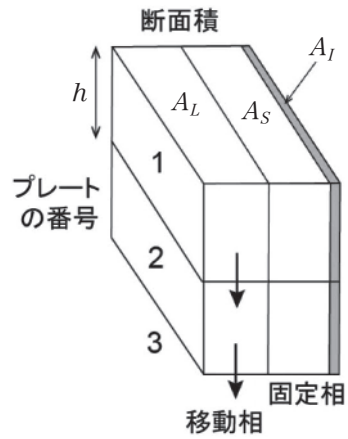


図5. クロマトグラフのプレートモデル

まりガラス管の円の断面積) A に相当する。

$$A = A_S + A_L + A_I \tag{3}$$

プレート1枚における移動相の体積は hA_L である。固定相の体積は hA_S であるが、分配率 α を考慮して $h\alpha A_S$ とみなす。つまり、1枚のプレートにおける溶媒の見掛けの体積 V は

$$V = h(A_L + \alpha A_S) \tag{4}$$

である。はじめ1番目の板にすべて存在していた物質は、新しい展開溶媒が上から δv だけ注ぎ込み、そして移動相が δv だけ次の下の板に移動した段階で、その存在比が $1 - \delta v/V$ に減少する。これを n 回くり返すと1番目の板における物質の存在比は $(1 - \delta v/V)^n$ となる。また、 $n + 1$ 番目の板における物質の存在比は $(\delta v/V)^n$ となり、 $r + 1$ 番目 ($0 \leq r \leq n$) の板における存在比 Q_{r+1} は次式のような⁶⁾。

$$Q_{r+1} = \frac{n!(1 - \delta v/V)^{n-r}(\delta v/V)^r}{r!(n-r)!} \tag{5}$$

この先の詳しい導出は省略するが、 Q_{r+1} は $r = v/V$ を満たすときに最大となる。よって、その物質のバンドの移動距離は $hr = hv/V$ である。クロマト管に対する展開溶媒の通過距離は、流れ出した溶媒の体積 v を全断面積 A で割った値として算出する。カラムクロマト法では溶媒の流速は一定となるので、その移動距離は移動の速さに相当する。そして、その移動率 (rate of flow) R を次のように定義する。

$$\begin{aligned}
 R &= \text{バンドの移動速度} / \text{展開溶媒の流速} \\
 &= (hv/V) / (v/A) \\
 &= A / (A_L + \alpha A_S)
 \end{aligned} \tag{6}$$

以上が、カラムクロマト法における移動率の理論的な背景である。

ただし、式 (6) をそのままペーパークロマト法に適用するのは不便である。なぜなら、カラムクロマトとは異なり、全断面積 A は実測しにくいからである。このため、定義を次のように少し変え⁷⁾、また混乱しないように、ちがう記号を用いることが提案された⁸⁾。

$$\begin{aligned}
 R_f &= \text{スポットの移動速度} / \text{移動相の移動速度} \\
 &= A_L / (A_L + \alpha A_S)
 \end{aligned} \tag{7}$$

ただし、記号に使われている添字の f は何に由来しているのか、初めて定義が掲載された論文には明記されていない。想像するに、スポットの移動速度 (rate of movement) を表わすのに添字として m を使いたいところであるが、それは移動相 (mobile phase) と混同するのを避けたのであろう。 f は flow からきていることはほぼまちがいない。

3-4. ろ紙への溶媒の浸み込み

通常、ペーパークロマトグラフィーでは、乾いたろ紙をクロマト管中に鉛直に吊るし、その下端を展開溶媒の中に入れる。そうすると、毛細管現象によって、溶媒がろ紙に浸みていき、重力に逆らいながら移動相が上昇していく。このときの溶媒先端の位置の時間変化について、理論ならびに実験の両面から研究がなされている。溶媒の先端がろ紙の原点に達したときを時間 0 とし、時間 t において原点から溶媒先端までの距離を h とすると、初期段階では h が \sqrt{t} に比例する。しかし、上部へ溶媒が上るほど重力による抑制がかかるため、移動速度はしだいに減少していく^{9,10)}。つまり、カラムクロマトとは異なり、ペーパークロマトでは展開溶媒 (あるいは移動相) が一定の速度で流れているわけではない。よって、スポットの移動速度も一定ではないため、 R_f 値を移動率とよぶのには無理がある。

ろ紙は空気中の水分を吸収しており、そのろ紙を用いたペーパークロマトグラフ法は、その吸着した水も含めたる紙と展開溶媒との間の分配にもとづく。したがって、展開溶媒に水を用いたときは、物質がろ紙への吸着や析出などしなければ、化合物によらず R_f は同じ値になると推定される¹¹⁾。なお、ろ紙の吸着水を有機溶媒に置き換えて固定相とし、別の種類の有機溶媒を使って展開する方法もある¹²⁾。

4. 実 験

4-1. ろ紙の水分

ペーパークロマトに使用しているろ紙 (ADVANTIC クロマトグラフ用ろ紙 No. 50) $0.25 \times$

表 1. R_f 値の測定例 (20°C)

展開溶媒	ローダミン B	メチルオレンジ	インジゴカルミン
水	0.22 ^{a), b)}	0.68 ^{b)}	0.88
水 : MeOH (3 : 1)	0.69	0.79	0.90
水 : MeOH (1 : 3)	0.95	0.83	0.69
MeOH	0.96	0.72 ^{b)}	0.34 ^{a), b)}

a) 原点を始点とするテーリングがある。

b) スポットの長さが、展開溶媒の移動距離 L の 30 % 以上である。

20 × 400 mm 10 枚を約 100°C のオーブンで乾燥させ、重量変化を測定した。その結果、室温 20°C において空気に触れているろ紙は、水分を重量比で約 5 % 含んでいることがわかった。この吸着水が固定相としてもはたらくと推定される。

4-2. 展開溶媒による R_f 値の変化

水とメタノールの 3 : 1 および 1 : 3 の混合溶媒で、3 種類の色素 (ローダミン B, メチルオレンジ, インジゴカルミン) のそれぞれを単独で展開したときの R_f 値の測定例を表 1 に示す。比較のため、水およびメタノールだけで展開し、その結果も加えた。おおまかに見ると、メチルオレンジは水とメタノールの比率が変わっても、 R_f 値は 0.7~0.8 でほぼ一定である。それに比べて親油性の高いローダミン B は、メタノールの比率が高くなるほど R_f 値が大きくなり、逆に親水性の大きいインジゴカルミンは R_f 値がしだいに小さくなっている。

水だけを使って展開した場合について、3 つの色素の R_f 値は明らかに異なっている。ローダミン B は水に非常に溶けにくいいため析出し、原点を始点とするテーリングを生じさせたと推定される。同様のテーリングは、メタノールだけを使ったときのインジゴカルミンにも見られる。よって、水とメタノールの混合溶媒を使うことで、このようなテーリングを避けているといえる。

ちなみに、インジゴカルミンの水溶液は数カ月以上の長期保存で徐々に退色する。その吸光度減少の様子ならびに反応機構については、先の論文で紹介した¹³⁾。ペーパークロマトで展開を終えたる紙においてもインジゴカルミンの青いスポットは退色してしまうため、参考結果として残しておきたいときには写真の形で保存しておく必要がある。

5. 考 察

5-1. 略号 R_f の読み変え

元来、 R_f は、カラムクロマトグラフ法における移動率、つまり溶媒移動相の流速を基準としたときの溶質の移動速度に相当する。しかし、ペーパークロマトグラフ法においては、展開

溶媒が一定速度で流れているわけではないので、厳密な意味で移動率とはいえない。その一方で、展開結果を数値化するために、 R_f 値は実用的であり、その記号が慣習的に使われている。そこで、当初の理論とは切り離して、現在では便宜上 retention factor や retardation factor というように、略号の読み変えが行なわれている。

化学実験に関する和書では、「 R_f (移動率, rate of flow)」という従来の表現がそのまま残っているケースが多く見られる。ただし、略号の由来を不記している例もある。学会などでの現状を知るために、英文の論文における表現をデータベース Web of Science で調べてみた。このときの検索条件として、論文中のどこかに Rf およびそれぞれのよび方 (たとえば “retardation factor”) を含むこととし、発表の期間は全範囲とした。その結果、「rate of flow」の使用例が 1 件 (2006) であり、「retention factor」(保持因子) が 22 件 (1997~2015)、「retardation factor」(遅延因子) が 24 件 (1991~2014) であった。ちなみに、「relative to front」(前線と比較して) という読み変え案もあるが¹⁴⁾、英文の論文での使用例は今のところ見られなかった。ただし、国際学会の口頭発表などでは使われているようである。

他の分野におけるこのような略号の読み変えの類似例として、X 線結晶構造解析における R 因子があげられる。これは構造モデルにもとづいて計算した回折 X 線強度が、その測定値とどれほど一致しているかを表わす指標であり、かつては Reliability factor (信頼度因子) とよばれた。しかし、計算値が実測値をうまく再現しているほど R 因子が下がるので、信頼度の高さとは逆行する。このため、現在では計算値がまだ実測値を再現できていない割合という意味で、Residual factor (残差因子) とよばれるようになった。これは、専門用語の見直しが多く分野で比較的早く進んでいることを物語っている。

5-2. スポットの位置

ろ紙の下から約 2 cm のところに原点の線、つまりスタートラインを引く。そして、 R_f 値を求めるときには、原点から溶質のスポットの先端までの距離ではなく、重心位置までの距離を使

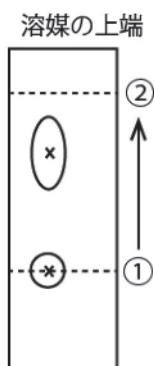


図 6. ペーパークロマトでの①スタート (原点) と②展開後。点線はろ紙に溶媒が浸み込んだ上端を表わす。

う。その理由は、原点に溶媒の先端が到達した瞬間を考えればわかるであろう。まさにそのとき、展開される物質の重心位置に溶媒が到達し、両者が同時に動き出すことになるからである(図 6)。

参考文献

- 1) 「化学大辞典」(大木道則他編集, 第 1 版, 東京化学同人, 1989 年)
- 2) 「理化学辞典」(長倉三郎他編集, 第 5 版, 岩波書店, 1998 年)
- 3) 「大学課程 一般化学」佐々木洋興, 辻岡昭, 膳昭之助, 大矢徹著(オーム社, 1968 年). クロマトグラフィーによる定性分析 [実験 6] pp. 264-265
- 4) 「化学実験」名古屋工業大学化学教室編(学術図書出版 1990 年). ペーパークロマトグラフィー, pp. 82-85
- 5) 「機器分析」田中誠之, 飯田芳男著(裳華房, 1982 年). pp. 288-323
- 6) Martin, A. J. P. & Synge, R. L. M. (1941) "A new form of chromatogram employing two liquid phases." *Biochem. J.*, **35**, 1358-1368
- 7) Le Rosen, A. L. (1942) "A method for standardization of chromatographic analysis," *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 1905-1907
- 8) Consden, R., Gordon, A. H. & Martin, A. J. P. (1944) "Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper," *Biochem. J.*, **38**, 224-232
- 9) Nagasaki, M. & Osagawa, K. (1958) "Penetration of liquids into filter paper used in paper chromatography," *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 344-348
- 10) Gillespie, T. (1959) "The capillary rise of a liquid in a vertical strip of filter paper," *J. Colloid. Sci.*, **14**, 123-130
- 11) Dikstein, S. (1959) "The effect of molecular structure on the R_f value, a contribution to the theory of paper chromatography," *J. Chromatog.*, **2**, 204-209
- 12) 豊口 満, 清水 勲「有機溶媒を固定相とする分配ペーパークロマトグラフィーによる 1 価フェノール類の分離」工業化学雑誌, **61**, pp. 1471-1473 (1958 年)
- 13) 小畠りか, 大場 茂「インジゴカルミン水溶液中の信号反応および分解退色」慶應義塾大学日吉紀要, 自然科学, No. 59, pp. 1-13 (2016 年)
- 14) 上村礼子「クロマトグラフィーを用いた分離・定性・同定—薄層クロマトグラフィーの活用—」化学と教育, **63**, pp. 552-555 (2015 年)