

実験 E-1 (液体クロマトグラフィーによるお茶中カフェインの定量)

共同実験者:藤田悠介, 古川絢深

1. 目的

分離分析手法の一つである液体クロマトグラフィーを用いてお茶中の成分を分離し, その中に含まれるカフェイン濃度の定量を行う. 検量線を用いて濃度を算出する手法と, 試料の確認のための添加法を実際に行う.

2. 実験

2.1. 条件

装置:液体クロマトグラフ	試料:
計量器:100 μL マイクロシリンジ/最小目盛り 2.0 μL	・カフェイン標準試料
フィルター:0.45 μm	0.06, 0.09, 0.15, 0.21, 0.3 mg mL^{-1}
検出:吸光度検出/254 nm	・家で入れてきたお茶
カラム:ODS/内径 2 mm, 長さ 150 mm	1. 麦茶
溶離液:0.1%リン酸水溶液/アセトニトリル(40/7)	2. ほうじ茶
流速:300 $\mu\text{L min}^{-1}$	・市販のお茶
	3. お〜いお茶(緑茶)
	4. TV お茶(緑茶)

2.2. 操作

- ① カフェイン標準溶液の調整を行った. 標準溶液は濃度 0.3 mg mL^{-1} を希釈し, 0.06, 0.09, 0.15, 0.21, 0.3 mg mL^{-1} を 100 μL マイクロシリンジにより計り取り作成した.
- ② LC により各標準溶液の測定を各 10 分程度行った. 測定の順番は濃度 0.3 mg mL^{-1} を初めに行い, その後は濃度の低いものから行った.
- ③ 標準溶液の測定を行う間に, 用意したお茶 1-4 を 0.45 μm フィルターでろ過し, 試料溶液を作成した.
- ④ 試料番号順に LC を各 12 分を行った.
- ⑤ TV お茶とカフェイン標準試料 0.3 mg mL^{-1} を 1:1 で混合し, LC を行った.
- ⑥ 標準溶液の検量線を作成した.

3. 結果

3.1. 濃度とピーク長さの関係

標準溶液の測定結果をもとに、検量線を作成した(図 3.1.)。図 3.1. については、測定点すべてを用いて検量線作成した。

この検量線を用いて試料 1-4 のカフェイン濃度を求め、表 3.1. に示す。

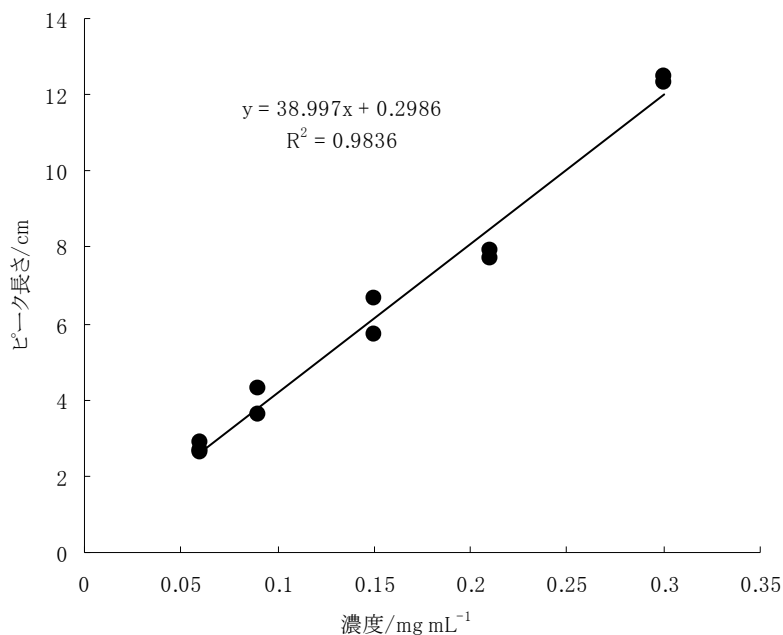


図3.1. 濃度とピーク長さの関係

表 3.1. 試料の測定結果

試料	ピーク長さ /cm	カフェイン濃度 / mg mL ⁻¹
麦茶	0.30	0.000
ほうじ茶	0.05	-0.006 ¹⁾
お〜いお茶	6.45	0.158
TV お茶	5.90	0.144

1) 負の値となったのは、切片補正の前だからである。考察 4.2. 直線性にて後述。

4. 考察

4.1. 有効数字

本実験で計量の際に使用した 100 μL マイクロシリンジは、最小目盛り 2.0 μL であることから計量毎に $\pm 1.6 \mu\text{L}$ の機器誤差が考えられる^[1.1.]。この他、標準試料の LC 測定を行った際、ピークが常に一定ではなく、毎回異なる値を示していた。

この 2 点の誤差から有効数字を決定する。

4.1.1. マイクロシリンジによる機器誤差

本実験では、0.3 mg mL^{-1} カフェイン標準溶液を希釈して作成したので、マイクロシリンジによる最大誤差時の濃度 ε は、

$$\varepsilon = 0.3 \times \frac{L + 1.6}{W - 1.6}$$

L: 0.3 mg mL^{-1} カフェイン標準溶液の量, W: 蒸留水の量

として求められる。よってこの最大誤差の生じたときに起きる誤差を表 4.1.1. に示す。

表 4.1.1. 機器誤差

濃度/ mg mL^{-1}		機器誤差	
誤差なし	最大誤差時	絶対/ mg mL^{-1}	相対/%
0.06	0.062	+0.002	3.2
0.09	0.092	+0.002	2.3
0.15	0.152	+0.002	1.6
0.21	0.213	+0.003	1.3
0.3	0.300	0.000	0.0

したがって、機器誤差においては有効数字小数点以下第 3 位までと分かる。

4.1.2. ピーク範囲による誤差

標準溶液の測定は 2 回行ったが、ともに異なるピーク長さが与えられた。したがって、その測定誤差について考察し、有効数字を決定する。測定誤差について表 4.1.2. に示す。

表 4.1.2. 測定誤差

濃度 /mg mL ⁻¹	ピークずれ /cm	誤差/mg mL ⁻¹	
		絶対	相対
0.06	-0.25	-0.006	-10.3
0.09	-0.70	-0.017	-19.3
0.15	-0.95	-0.024	-15.7
0.21	-0.20	-0.005	-2.4
0.3	+0.20	+0.005	+1.7

表 4.1.2.より, 濃度 0.09 際の測定誤差は機器誤差より一桁多い数値となっていた. したがって, 本実験は機器誤差よりも測定誤差による影響が大きいと分かり, 有効数字は, 濃度 0.09 mg mL⁻¹と 0.15 mg mL⁻¹については小数点第 3 位, それ以外は小数点以下第 2 位である.

4.2. 図 3.1.の直線性

図 3.1. において, 相関係数 R²は 1 にあまり近い値をとっていなかったため, 表 3.1. に算出した濃度はあまり信頼性の高いものとはいえない. したがって, 直線性について考察する.

直線性低下の原因として, 測定毎のピークがかなり異なったことや, 濃度 0.21 mg mL⁻¹の測定ピークが直線から完全に外れている点が挙げられる.

まず, 濃度 0.21 mg mL⁻¹の測定ピークは 2 回ともかなり近いピークを示している. したがって機器による誤差ではなく, 濃度が正確でないことが考えられ, この測定点は実験データに含むべきでない.

次に, 測定毎のピークのずれについてであるが, どちらの値が正や誤であり, どちらかのみを採用するというのは, 実験条件(温度や用いた機器等)が全く等しいために適当でない. さらに, LC 入口の共洗いの不十分による標準溶液の誤差も考えられるが, まず初めに 0.3 mg mL⁻¹の測定を行った後に最も低い濃度の標準溶液の測定を行ったため, この点で誤差が最も起こりうると考えられる. しかし図 3.1.より, その 0.06 mg mL⁻¹の測定時のピークは他の測定点と比較して, 値が近く, 安定していることがわかる. よって, 共洗い時の汚染によるピークのずれは考えにくいとため, 1 回目-2 回目の測定点はどちらもこれらの誤差によるものでないとわかる.

以上の点から, 測定毎のピーク長さはどちらかが正しいとは判断できないので, 次の 2 点を考慮しなければならない.

- (1) 濃度 0.21 mg mL⁻¹時の測定点は除く.
- (2) 測定毎のピーク長さの平均についてプロットする.

さらに、図 3.1. の切片が 0 でないことから、ピーク長さ 0.00 cm, すなわち理論カフェイン濃度 0.0 mg mL^{-1} においてもカフェイン濃度が約 0.3 mg mL^{-1} 程度計測されることを示唆している。これは理論に沿わない現象であり、考察する必要がある。そこで次の 2 点に場合を分け考察した。

仮定①: 0.3 mg mL^{-1} 標準溶液の濃度が 0.300 mg mL^{-1} だと仮定した場合

作成した濃度よりも高くなっていることから、純水中か、または他の汚染によってカフェインが多めに測定されたと考えられる。しかしこれは極めて抽象的で確証はない。したがって、与えられた標準溶液の有効数字に着目し、①の仮定の逆を考える。

仮定②: 0.3 mg mL^{-1} 標準溶液の濃度が 0.300 mg mL^{-1} でなかったと仮定した場合

もともと、標準溶液は濃度 0.3 mg mL^{-1} 小数点以下 2 桁目の値が確かでない。このため、実際の値と異なり、それが切片誤差に寄与した可能性がある。

ここで、濃度 0 mg mL^{-1} におけるピーク長さ 0.2986 cm が生じるには、図 3.1. の直線式より、以下だけ濃度がすでに高かったと求められる。

$$\frac{0.2986}{38.997} = 0.0077 \text{ mg mL}^{-1}$$

これは、有効数字は小数点以下 1 となっていることから十分考える値であり、標準試料 0.3 mg mL^{-1} の濃度は、実際には 0.308 mg mL^{-1} 程度であったと考えられる。

しかし、標準溶液は濃度 0.3 mg mL^{-1} のものを希釈して作成したため、もともとの濃度が違っていたとしても、検量線が X 軸方向に伸縮するだけで切片は変化しない。

よって、仮定②のように濃度が正確でなかったことも考えられるが、切片補正においては仮定①による必要がある、と考察でき、実際の上記 2 点に付け加え、さらに切片を 0 となるようピーク長さを補正し、検量線を作成する。

これら 3 点を考慮し作成した検量線が、右図の図 4.1. である。

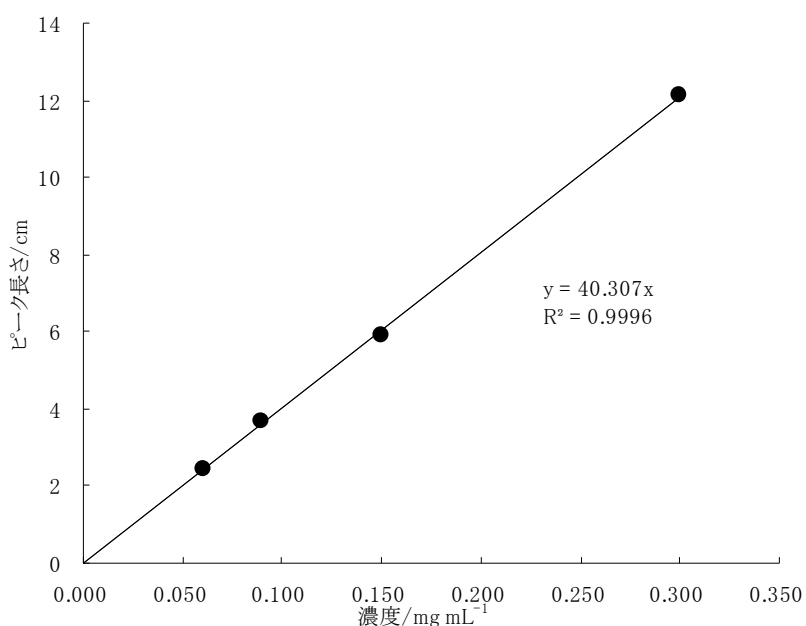


図4.1. 濃度と平均ピーク長さの関係

図 4.1. より, 直線性が向上していることから, 補正前より信頼性は高くなったと考えられる. したがって, この検量線から試料濃度の算出をし直し, 表 4.2. に示した.

表 4.2. 測定結果の補正後の値

試料	カフェイン濃度 / mg mL ⁻¹
麦茶	0.007
ほうじ茶	0.001
お〜いお茶	0.160
TV お茶	0.146

4.3. 添加法によるカフェインの同定

添加法により, TV お茶に 0.3 mg mL⁻¹ カフェイン標準溶液を1:1で混合した溶液の測定結果から TV お茶試料中のカフェインを同定する. TV お茶のピークが標準試料添加によりピーク高さが高く推移していることが認められた^[2.1.]. その他のピークについては, 体積が約 2 倍になったことから濃度が減少していることがわかる.

しかし, 一般には, 以上の操作だけで物質の種類を断定するのは無謀である. ピークの位置がある程度接近していると, 1 つのピークになって, かえってわずかな保持体積の違いはわからないものである. したがって, これだけの実験では完全に絞りきれないことが多い.

それゆえ, その同定の精度を上げるために溶離条件を変え, いくつかの条件でピークが常に一致するか確認しなければならない^[2.2.].

4.4. クロマトグラフについて

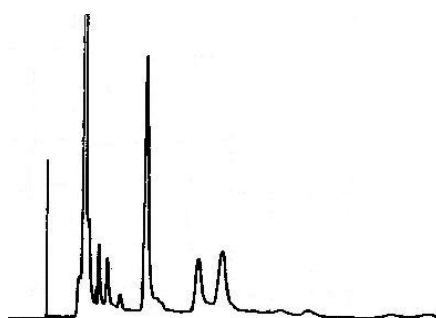


表 4.4.1. お〜いお茶

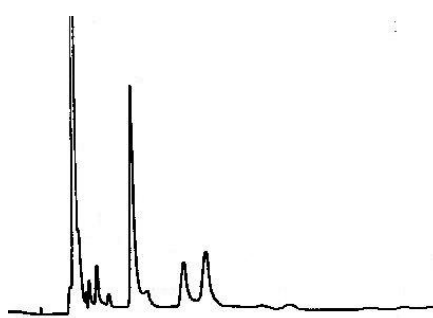


表 4.4.1. TV お茶

このどちらのクロマトグラムも緑茶であるため, とてもよく似たピークを示していることがわかる. しかし, 個々の特徴は必ず現れていて, まったく同じわけではなかった.

5. 課題

5.1. 溶離液中のアセトニトリル濃度を大きくすると、溶出時間はどうなるか？

短くなる。カフェインは油性・水性溶媒のどちらにも溶けるが、やや有機溶媒へのほうが溶けやすい。本実験は、移動相である溶媒の極性は固定相より大きく、極性が小さい溶媒ほど溶媒強度が大きい逆相モードの液体クロマトグラフィーである^[5.1.]。移動相は大多数のリン酸の影響で極性となっているが、ここへ比較的極性の小さいアセトニトリルの比率を大きくすることで移動相の疎水性化合物の保持力が上がる。このため、カフェインが移動相へ溶けやすくなり、溶出時間は短縮される^[4.1.]。

5.2. 溶離液中のアセトニトリルを同濃度のメタノールに変えると、溶出時間はどうなるか？

短くなる。Macek, Prochazka の溶媒系列によると、エタノールはアセトニトリルよりも極性の小さい化合物である^[3.2.]。したがって、試料成分の保持時間が短くなり、溶出時間は短縮される。

5.3. 固定相を ODS(C18)から C8 に変更すると、溶出時間はどうなるか？

短くなる。オクチル基 C_8 はオクタデシル基 C_{18} よりも疎水性が小さい。したがって、疎水性化合物の保持力は C_8 のほうが小さく、また炭素数のより小さいブチル基 C_4 ではさらに保持力が小さくなる^[4.2.]。したがって、試料成分の保持時間が短くなり、溶出時間は短縮される。

7. 参考文献

- [1.] ANALYCAL CHEMISTRY
2005, 6th edition, Gary D. Christian 著, 丸善
[1.1.] p 44
- [2.] 液体クロマトグラフィー理論と実際
1977, 初版, 江頭暁 著, 三共出版
[2.1.] p 116, [2.2.] p 117
- [3.] 液体クロマトグラフィーとその応用
1989, 初版, 波多野博行ら 著, 講談社
[3.1.] p 100-101, [3.2.] p 107
- [4.] 若手研究者のための機器分析ラボガイド
2006, 初版, 澤田清 著, 講談社
[4.1.] p 207, [4.2.] p 206
- [5.] クロマトグラフィー分離システム 考え方, 学び方
1981, 初版, 原昭二 著, 丸善
[5.1.] p 286-287