

カフェインの抽出と紫外吸収スペクトル

令和4年4月19日

1年 I類 8クラス 2210632 宗村 キヤ

0. 10分間テスト

0.1. この実験で沈殿を生成させるために入れる薬品は何か。

ポリフェノールなどの親水コロイドを塩析するために水酸化カルシウムを加える。

0.2. ろ過の操作を中心に実験操作を箇条書きかフローチャートで書きなさい。

- ・茶葉約5gを電子天秤で秤りとり、300mLビーカーに入れる
- ・水道水を75mL程加えてビーカーをバーナーで加熱する
- ・沸騰後10分間茶葉を熱湯で抽出する
- ・冷めないうちに抽出液を、大きさを合わせたろ紙をつけたブフナーロート上に注ぎ、ビーカーに残った茶葉も洗い出して、洗液と併せて吸引ポンプで吸引びんに吸引ろ過する
- ・茶殻を捨ててろ液を300mLビーカーに移し、水酸化カルシウム2.0gを加えて加熱し、3分間沸騰させる
- ・熱いうちにブフナーロートで吸引ろ過し残った沈殿は洗浄する
- ・ろ液を直火で蒸発乾固寸前まで加熱して濃縮し、沈殿した水酸化カルシウムや茶葉中の不溶性成分を吸引ろ過で除去する
- ・エタノール15mLと活性炭を小さい薬さじで1さじ加えて、ビーカーを熱湯につけ加温しながらかき混ぜる
- ・円錐形に折ったろ紙をつけたロートでろ過をして活性炭を除く
- ・ろ液を100mLビーカーにとり、残った固形物もエタノール2mLで洗い出して洗液もビーカーに加える
- ・ガラス棒で、液をスタンドグラス上に塗り、カフェインの結晶が成長する様子を顕微鏡で観察する
- ・傷や欠けのない専用の試験管を使用して、先の手順で得られたカフェイン抽出溶液を約0.5mL、スポイトで試験管に入れる
- ・試験管エバポレーターでアルコールを除去して、試験管に10%KI溶液を2滴落として固形物を溶かす
- ・硝酸ビスマス溶液1滴を加えて、橙色沈殿の様子を見る。
- ・カフェイン抽出溶液を少量取り、蒸留水で希釈する
- ・分光室に置かれた、きれいに洗った石英セルに希釈した溶液を8分目まで入れ、紫外可視分光光度計の手前にある試料光路にセットする
- ・奥にある対照光路には蒸留水を入れた石英セルをセットする
- ・測定法マニュアルに従い測定を行い、205nm付近のピークの吸光度が3を下回るように溶液を希釈してスペクトルを取る
- ・スペクトルチャート紙に波長、吸光度、試料名などの必要事項を書き込む
- ・セルを洗浄し指定位置に置く

0.3. この実験で測定するスペクトルでは、分子の何が励起されるか。

C=O結合のO原子にある非共有電子対の1つの電子もしくは結合性π軌道上の電子

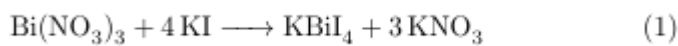
1. 目的

物質の単離（混合物から1つの純物質を取り出すこと）、精製および確認する方法を、例として茶葉からのカフェインの抽出を取り上げて学習する。併せてその結晶成長を観察すると同時に、紫外吸収スペクトルを測定し、スペクトルと構造との関連を調べる。

2. 原理

カフェインは茶葉中に2~3%、茶湯中に約50ppm含まれる天然の第三級アミンである。主な用途は医薬品であり、薬効としては眠気や倦怠感、そしてある種の頭痛を緩和する作用がある。なお、茶葉には他にも類似した構造を持つテオブロミンが含まれているが、こちらは薬効としては利尿作用や気道の拡張作用などがある。

まず、カフェインに10%KI溶液を滴下し、硝酸ビスマス溶液を加えた際に、二種の溶液の混合によりドラージェンドルフ試薬が生成される。



このとき、カフェインは試薬中の酸と反応して分子中の二重結合を持たないN原子にH+が配位して錯体を形成する。

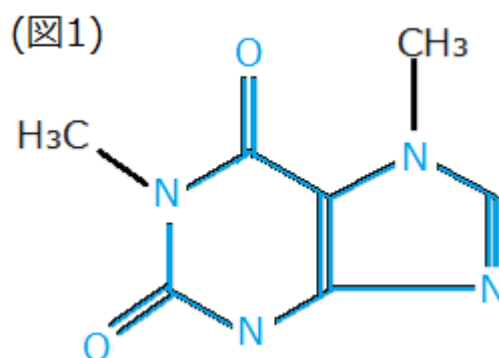


この錯体と試薬が反応して沈殿し呈色する。



ここで、硝酸ビスマス(III)は水に難溶で塩酸や硝酸には速やかに溶けるため、溶媒は塩酸や硝酸になっている。カフェインは弱塩基性であるが、溶液が酸性のためドラージェンドルフ試薬でも問題なく呈色反応が起こる。

そして、紫外吸収スペクトルが観察される原因は、C=O結合にある電子のエネルギー状態が変化するためである。赤外線より長い波長領域では光が吸収されても分子の振動が変化するだけに留まるが、紫外線より短い波長領域においては、光の吸収によって基底状態という低エネルギーの状態から、励起状態という高エネルギーの状態に移ることが可能なだけのエネルギーを電子が獲得できるためこの波長領域において一部の波長の光を吸収する。また、この時電子のエネルギー準位の遷移に必要なエネルギーに近い量のエネルギーをもつ光がより吸収されやすくなるため、吸光度のグラフはカフェインの標準スペクトルのような形状となる。なお、カフェインは(図1)の水色部分が共役系であるから、π軌道にある電子の遷移が本来よりも起こりやすくなっているため、より長波長側でも光の吸収が起こる。



3. 実験

3.1. 実験器具

電子天秤（タニタ KD-320, 感量 0.1g), 薬包紙, ダイアフラム型ドライ真空ポンプ DA-15S (アルバック機工), 吸引びん, ブフナーロート, ろ紙, 軍手, 湯浴, 顕微鏡 (オリンパス CX22LED型), スライドガラス, ビーカー (50, 100, 300mL), メスシリンダー (100mL), 攪拌棒, ロート, ロート立て, 試験管, 薬さじ, ミクロスパチュラ, こまごめピペット (2mL)

3.2. 試薬

茶葉, 水酸化カルシウム, エタノール (変性アルコールを用いる), 10%ヨウ化カリウム溶液, 硝酸ビスマス溶液, 活性炭, 蒸留水, 希塩酸

3.3. 実験装置

紫外可視分光光度計 (日本分光 V-550DS)

3.4. 実験手順

3.4.1. 茶葉からのカフェインの抽出

茶葉約5gを電子天秤で秤りとり, 300mLビーカーに入れた。

これに, 水道水を75mL程加えてビーカーをバーナーで加熱した。

このとき, 泡立った状態で吹きこぼれないようにしながら沸騰後10分間茶葉を熱湯で抽出し, 冷めないうちにこれを, 大きさを合わせたろ紙をつけたブフナーロート上に注ぎ, 吸引ポンプで吸引びんに吸引ろ過した。ビーカーに残った茶葉も忘れずに流しだして, これも併せてろ過をした。

茶殻を所定のバケツに廃棄した後にろ液を300mLビーカーに移し, これに水酸化カルシウム2.0gを加えて加熱し, 3分間沸騰させた。

その後, 熱いうちにブフナーロートで吸引ろ過し残った沈殿は洗浄した。

ろ液は直火で蒸発乾固寸前まで加熱して濃縮し, 沈殿した水酸化カルシウムや茶葉中の不溶性成分を吸引ろ過で除去した。

エタノール15mLと活性炭を小さい薬さじで1さじ加えて, ビーカーを熱湯につけ加温しながら攪拌した。円錐形に折ったろ紙をつけたロートで活性炭を除き, ろ液を100mLビーカーにとった。残った固形物もエタノール2mLで洗い出し, 洗液もビーカーに加えた。ガラス棒で, 液をステンドグラス上に塗り, カフェインの結晶が成長する様子を顕微鏡で観察した。

3.4.2. カフェインの確認

傷や欠けのない専用の試験管を使用して, 先の手順で得られたカフェイン抽出溶液を約0.5mL, スポイトで試験管に入れて, 説明書の指示に従い試験管エバポレーターでアルコールを除去した。その後, 試験管に10%KI溶液を2滴落として固形物を溶かした。これに硝酸ビスマス溶液1滴を加えて, 橙色沈殿の様子を見た。

3.4.3. 紫外吸収スペクトルの測定

カフェイン抽出溶液を少量取り，蒸留水で希釈した。

分光室に置かれた，きれいに洗った石英セルに希釈した溶液を8分目まで入れ，紫外可視分光光度計の手前にある試料光路にセットし，奥にある対照光路に蒸留水を入れた石英セルをセットした。

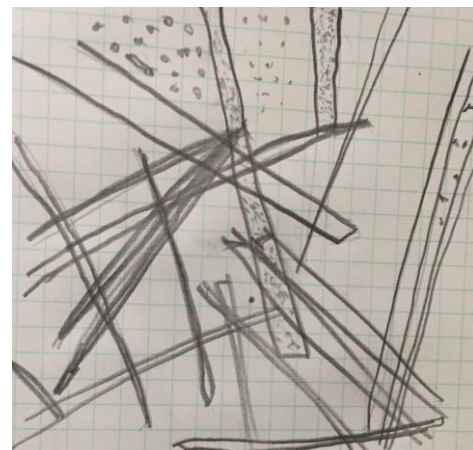
その後，測定法マニュアルに従い測定を行い，205nm付近のピークの吸光度が3を下回るように溶液を希釈してスペクトルを取った。そして，スペクトルチャート紙に波長，吸光度，試料名などの必要事項を書き込んだ。最後に，セルを洗浄し指定位置に置いた。

4. 結果

4.1. カフェインの抽出

水酸化カルシウムを加えて煮沸した際のろ液と沈殿の状態について記す。濾液は褐色透明で泡立っていた。そして，沈殿も褐色であったが部分的に色が薄かった。

次に，得られたカフェインの結晶について記す。右に結晶のスケッチを示す。結晶は小さく針状で観察した限りでは褐色のものと緑色のものが見られた。



4.2. カフェインの検出

手順に沿って10%KI溶液と硝酸ビスマス溶液を加えると，液は鮮やかな橙色の呈色反応を示した。

5. 考察

カフェインの抽出の際に生じた沈殿は，茶葉に含まれるポリフェノールやカテキンが水酸化カルシウムを加えたことによって塩析が起こった為に生じたと考えられる。

紫外吸収スペクトルを観察すると，ピークが2つありこのうち一方が $n-\pi^*$ 遷移で，もう一方が $\pi-\pi^*$ 遷移であることが分かる。そして， n 軌道は π 軌道よりも高エネルギーであり，また $n-\pi^*$ 遷移は $\pi-\pi^*$ 遷移よりも起こりづらいので，より短波長側にある1番のピークが $n-\pi^*$ 遷移によるものであることが考えられる。よって，2番のピークは $\pi-\pi^*$ 遷移によるものであることも分かる。このことと先に述べた原理を踏まえて考察すると，紫外吸収スペクトルを測定して標準スペクトルと比較することによって，試料中の不純物の含有量をだまかに調べることができるのではないだろうか。吸光度とは紫外線を媒質がどれ程吸収したのかを表す量であり，原理の節で述べた通りこれは物質の構造によって変化する。つまり，吸光度のグラフは各物質に固有の形状をしているのである。もし，不純物が含まれているのならグラフをプロットした際に標準スペクトルとグラフの形のズレが大きくなるのだろうと考えた。

6. 引用

『医療用医薬品：カフェイン（カフェイン「ケンエー」）』KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (https://www.kegg.jp/medicus-bin/japic_med?japic_code=00007772)

『KEGG COMPOUND: C07480』 KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?C07480+D00528+D01453+D01630+D07603+-ja)

『調査・資料 食品中のカフェイン, テオブロミン及びテオフィリンの含有量』 守安貴子・斉藤和夫・中里光男・石川ふさ子・藤沼賢司・二島太一郎・田村行弘, J-STAGE (https://www.jstage.jst.go.jp/article/shokueishi1960/37/1/37_1_59/_pdf)

『ドラーゲンドルフ試薬(TLC発色試薬)の作り方と原理と使い方!』 ネットdeカガク, Dot&Co. (https://netdekagaku.com/doragendorff_reagent/)

『医薬品インタビューフォーム：次硝酸ビスマス』 吉田製薬製品情報サイト (<https://www.yoshida-pharm.jp/files/interview/642.pdf>)

『UV TALK LETTER vol.2 紫外可視吸収と有機化合物の構造との関係』 株式会社島津製作所 (<http://www.an.shimadzu.co.jp/uv/support/lib/uvtalk/uvtalk2/apl.htm>)

『総説 光励起状態の反応(その1) カルボニル基のn, π^* 励起により引き起される光反応について』 手塚敬裕, J-STAGE (https://www.jstage.jst.go.jp/article/yukigoseikyokaishi1943/27/4/27_4_309/_pdf/-char/ja)