脂肪族アルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの 薄層クロマトグラフィーによる分離と定量*

武内 次夫，鈴木 義仁**，山崎 豊***

(1968 年 12 月 14 日受理)

脂肪族アルデヒド類を 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (以下 2,4-DNPH と略記) として薄層クロマトグラフィーによって分離し，2,4-DNPH の特性波長のデンシトメトリーによって，抽出操作を行わずにアルデヒドの組成分析を行なった。

セルロース粉末 (200~300 メッシュ) または Kieselguhr G を水に溶き，ガラス板上に 0.25 mm 厚の薄層を引く。室温で乾燥後，5% テトラリン-エーテル溶液に浸し逆相化を行なう。炭素数 $C_2 \sim C_{14}$ の脂肪族飽和アルデヒドの 2,4-DNPH を試料とし，90% メタノール-酢酸-テトラリン (10:1:1, 容積比) を展開溶媒に用い上昇展開を行なうと，炭素数の順序に各 2,4-DNPH のスポットが並び，良好な分離を示す。 R_f 相対値 ($C_6=1.00$ とした場合の各 R_f 値/ C_6 の R_f 値) は Kieselguhr G 薄層にあっては， C_2 1.64, C_3 1.50, C_4 1.34, C_5 1.25, C_6 1.00, C_7 0.86, C_8 0.70, C_{10} 0.50, C_{12} 0.41, C_{14} 0.36 である。セルロース粉末薄層における R_f 相対値もほぼ同じ値を示す。

展開後のセルロース粉末薄層に塩化ビニル-テトラヒドロフラン溶液を塗布したのち薄層をガラス板よりはがし取り，付属装置を用い 374 m μ で各スポットの吸光度測定を行なって，試料中に存在するアルデヒドの定量 (組成分析) を実施した。

1 緒 言

カルボニル化合物は原料や製品中に微量存在しても，製品の品位や製造過程中的反応に著しい影響がある。従来より微量カルボニル化合物の検出法として 2,4-DNPH 法が広く行なわれているが，個々のカルボニル化合物を分析するには，さらに適当な分離方法を必要とする。

著者らはすでに，ペーパークロマトグラフィー (PC) による 2,4-DNPH の分離¹⁾，定量²⁾，紫外・赤外分光光度法による定量^{3,4)} などについて報告した。今回は 2,4-DNPH の分離定量の簡易迅速化のため薄層クロマトグラフィー (TLC) による研究を行なった。

この化合物に関する TLC の研究は数多くなされているが⁵⁻⁷⁾，これらの多くのものはアルミナ，シリカゲルなどの吸着剤による吸着 TLC であって，その分離は必ずしも良好ではなかった。最近 Kieselguhr G を

Carbowax 400 などの極性有機物に浸した分配 TLC^{8,9)} を同族体分離に応用した研究がみられ良好な分離結果を得ている。

著者らはこの分配 TLC の利点に着目し，セルロース粉末および Kieselguhr G を無極性有機物テトラリンに浸せきさせた新しい分配 TLC 系について，2,4-DNPH の分離を試みた結果，Kieselguhr G はもちろん，セルロース粉末のような保持容量の少ない薄層においても良好な分離を得た。さらに 2,4-DNPH を分離後，セルロース薄層をいためないでガラス板からはが取る方法を考案し，薄層上のスポットの紫外吸光度測定により組成分析を迅速に行なう方法を確立した。

2 実験方法

2.1 試 料

実験には炭素数 $C_2 \sim C_{14}$ の脂肪族アルデヒドを使用した。各アルデヒドは市販品を蒸留精製した。得られたアルデヒドは 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンと反応させて¹⁰⁾，2,4-DNPH とした。各 2,4-DNPH は一定の融点に達するまで再結晶をくりかえして精製した。

試料溶液は 2,4-DNPH 約 5 mg/ml のベンゼン溶液とした。

* カルボニル化合物の 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの薄層クロマトグラフィー (第 1 報)

** 名古屋大学工学部合成化学科：名古屋市中種区不老町

*** 金沢大学教育学部化学教室：金沢市丸の内 1 丁目

2.2 クロマトグラフ系

固定相: (1) セルロース粉末-テトラリン (分離・定量用), (2) Kieselguhr G-テトラリン (分離用), のほか (3) シリカゲル G-テトラリンを比較のために使用した。

移動相: (1) 90% メタノール-酢酸-テトラリン (10:1:1, 容積比) (以下 MAT と略記) を主として使用し, このほか (2) 90% メタノール-酢酸-ベンゼン-テトラリン (10:1:1:1, 容積比), (3) 90% メタノール-エーテル-シクロヘキサン-テトラリン (10:5:2:1, 容積比), (4) 95% メタノール-テトラリン (10:1, 容積比), の諸系について検討した。なお, 上記移動相中のテトラリン量は飽和量に相当している。

2.2.1 薄層作製方法 セルロース粉末 (東洋ろ紙製 200~300 メッシュ) 10 g に 50 ml の水を少量ずつ加え, 乳ばちでじゅうぶんにかき混ぜる。これをスプレッター (ヤマト科学器械製) を用いてガラス板上に 0.25 mm の厚さに塗布し, 1 昼夜放置乾燥する。この薄層を 5% テトラリン-エーテル 溶液に 20 秒浸して引き上げ, 1~2 分空气中に放置後, ただちに実験に使用する。

また, 薄層面に 1.5 cm 間隔で, 展開方向と平行に幅 1 mm 程度の細みぞを付しておく, 展開溶媒が垂直に上昇し好適な結果が得られる¹¹⁾。

Kieselguhr G (メルク製) またはシリカゲル G (メルク製) で薄層を作製する場合も上とほぼ同じ要領で行なうが, この際は Kieselguhr G またはシリカゲル G 10 g に対し水 20 ml を加えて混和する。

2.2.2 展開方法 前項のようにして作製した薄層の下端より 2 cm のところにマイクロシリンジまたは毛細管で試料溶液 1 μ l を付着させ, 通常の縦型そう中で展開を行なう。

展開によって分離したスポットは明りょうな黄色を呈し, 紫外光の下で肉眼観察によって確認し, デンシトメトリーによって定量する。

2.3 定量方法

定量を目的とする場合はセルロース粉末で薄層を作製し, 展開後薄層からクロマトストリップを作製する。

2.3.1 クロマトストリップの作製 展開し終わった薄層は, 表面を保護するため, 4% 塩化ビニル-テトラヒドロフラン溶液に 10 秒間浸して (長時間浸すとスポットは拡散するが, この程度の時間では実質上その影響は少ない。この操作で薄層は強じんなフィルムになる) 引き上げヘアドライヤーで乾燥する。さらに薄層の表面にセロテープを張り補強する。このフィルムとガラス板の間に安全かみそりをくさびのように割り込ませながら, セルロース薄層をガラス板より注意してはがし取

る。Fig. 1 の装置に取り付けるため 2 cm 幅のクロマトストリップとする。

2.3.2 デンシトメトリー 各スポットの定量は分光光度計 (島津 Q-50 分光光度計) に特別な付属装置を取り付けて行なう。その構造略図は Fig. 1 のとおりである。

Fig. 1 Apparatus for densitometry attached to spectrophotometer

a: Feed roller; b: Guide roller; c: Drive roller; d: Feed meter; e: Window; f: Chromatostrip

クロマトストリップは写真機のロールフィルムのようにローラーで巻き取られる。送られた長さは側面にある送りメーター (d) で読み取られる。プリズムで分光された単色光はスリットを通して次に小窓 (e) を通り, ここでクロマトストリップ上のスポットで一部分吸収されて光電管にはいる。

紫外線波長は 374 m μ , スリット幅は 0.6 mm とし, 1 mm 送るごとに吸光度の読み取りを行なう。

バックグラウンドは測定前に, クロマトストリップのスポットのない部分の測定値平均より求めておく。

クロマトストリップの送られた長さ, 各吸光度測定値をプロットすると, 後述の Fig. 5 のような曲線 (以下デンシトグラムという) が得られる。この曲線の各ピーク面積から目的物質の相対量が得られる。

脂肪酸アルデヒドの 2,4-DNPH にあては, このよ

うにして得られた各スポットのピーク面積比は、各アルデヒドのモル比に相当することから試料の組成分析が可能となる。

$$a_2 : a_4 : a_6 : \dots = m_2 : m_4 : m_6 : \dots$$

ここで $a_2, a_4, a_6, \dots$: 各アルデヒドのピーク面積

$m_2, m_4, m_6, \dots$: 各アルデヒドのモル数

3 実験結果および考察

3.1 分離条件の設定

3.1.1 展開溶媒の選択 セルロース粉末の固定相担体にテトラリンを保持させた薄層を用い、各種展開溶媒について R_f 値を測定した。テトラリンによる逆相化は 2.2.1 の要領で行なった。

ベンゼン、エーテルのような無極性溶媒は固定相液体として付着させたテトラリンをよく溶解するため展開溶媒としては適当でない。そこでテトラリンで飽和できるような溶媒、90% アセトン、90% メタノール、90% 酢酸（いずれも容積%）、および水のおおのにテトラリンを飽和させたものを用い展開を行なった。その結果 Table I (a) の R_f 値を得た。

ここでメタノールを主成分とした系の分離効果が良好であることを認め、ついでメタノール-水系の任意の混合のものについて検討した結果、Table I (b) のような R_f 値を得た。この結果から 90~95% メタノールがかなりよい分離結果を示すことがわかり、さらにこの濃度のメタノール系に酢酸その他の第三物質を添加しその状況を検討した。その結果は Table I (c) のとおりである。いずれの展開溶媒でもテトラリンを飽和させることは前と同じである。

Table I (c) の 4 例はいずれも良好な分離を示すが、特に 90% メタノール-酢酸-テトラリン (10:1:1, 容積比) (MAT) が最もよい分離結果を与えることを見いだした。

3.1.2 固定相逆相化の条件選定 上記の各展開溶媒の R_f 値は固定相担体や固定相液体が変化すれば、異なることが予想される。良好な再現性を得るためには、固定相担体の種類やテトラリンの付着量などの逆相化の条件について規定する必要があるので、それについて検討した。

セルロース粉末薄層をテトラリン-エーテル溶液に浸し逆相化を行なう際、テトラリンの濃度をいろいろ変化させ、前述の MAT 系で展開した。その結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より明らかなようにテトラリンの比較的濃い溶液に浸し、固定相中のテトラリン保持量が大きくなるにつれて R_f 値は減少するが、各スポットが最も良

Table I R_f values ($\times 100$) of 2,4-DNPH of *n*-alkanals on cellulose powder layer impregnated with tetralin

Chain length	Solvent				
	90% acetone	90% methanol	90% acetic acid	Water	
(a)†					
C ₂	68	39	6	0	
C ₆	65	20	4	0	
C ₁₀	63	9	3	0	
	98% methanol	95% methanol	90% methanol	80% methanol	70% methanol
(b)†					
C ₂	68	55	39	29	19
C ₄	66	48	29	13	9
C ₆	64	43	20	6	3
C ₈	64	35	14	2	0
C ₁₀	62	21	9	1	0
	95% methanol-acetic acid-tetralin (10:1:1, v/v/v)	90% methanol-acetic acid-tetralin (MAT) (10:1:1, v/v/v)	90% methanol-acetic acid-benzene-tetralin (10:1:1:1, v/v/v/v)	90% methanol-ether-cyclohexane-tetralin (10:5:2:1, v/v/v/v)	
(c)†					
C ₂	60	69	58	77	
C ₄	49	60	45	70	
C ₆	36	47	32	61	
C ₈	25	33	24	54	
C ₁₀	16	20	20	52	

† Developing solvents must be saturated with tetralin.

Fig. 2 R_f values of 2,4-DNPH on cellulose powder layer impregnated with tetralin

好な分離を示すのは 5% テトラリン-エーテル溶液に浸した場合であった (3.5% テトラリン溶液では炭素数の小さいアルデヒドの分離が良好でなく、また 10% テトラリン溶液では炭素数の大きいアルデヒドの分離が不完全となった)。

3.1.3 固定相担体の選定 Fig. 2 の実験はいずれも

セルロース粉末を固定相担体として行なったものであるが, その他の担体についても検討しておく必要がある. そこでセルロース粉末, Kieselguhr G, およびシリカゲルGの3者を担体とし, テトラリンを固定相液体として保持させ逆相化を行なったプレートを用い, MAT 系で展開を行なった. その結果 (R_f 値の平均値) は Table II のとおりである.

Table II R_f values ($\times 100$) of 2,4-DNPH of n -alkanals on various adsorbents with MAT developing system

Chain length	Adsorbents		
	Silica gel G	Kieselguhr G	Cellulose powder
C ₂	58 (1.61)	72 (1.64)	69 (1.47)
C ₃	55 (1.53)	66 (1.50)	66 (1.41)
C ₄	47 (1.30)	59 (1.34)	60 (1.38)
C ₅	46 (1.27)	55 (1.25)	57 (1.21)
C ₆	36 (1.00)	44 (1.00)	47 (1.00)
C ₇	33 (0.92)	38 (0.86)	41 (0.87)
C ₈	26 (0.72)	31 (0.70)	33 (0.70)
C ₁₀	20 (0.55)	22 (0.50)	20 (0.47)
C ₁₂	14 (0.39)	18 (0.41)	16 (0.34)
C ₁₄	14 (0.39)	16 (0.41)	16 (0.34)

(): $R_{st}=R_f$ of compound/ R_f of C₆ derivative

Table II のようにいずれもよい分離結果を与えるが, 特に Kieselguhr G を用いた場合が最も良好であった. したがって分離のみを目的とする場合には Kieselguhr を担体として使用することが望ましい.

分離したクロマトグラムの1例を Fig. 3 に示した.

しかし後述のように分離したスポットを抽出せずただちにデンストメトリーで組成分析する場合には Kieselguhr G では透過率が小さいため, 使用困難であった. この場合には Kieselguhr G と類似の分離を示すセルロース粉末を固定相担体とする.

セルロース粉末薄層にあっては C₁₂ と C₁₄ の分離がふじゅうぶんであるが, ほかのアルデヒドの分離はよく, デンストメトリーの際に紫外光の透過率も高く, 低いバックグラウンドを与えるので定量に適している.

3.2 TLC による定量 (組成分析)

TLC を行なったのち, セルロース粉末薄層を前述の 2.3.1 の方法によってフィルム状のクロマトストリップとしたのち, デンストメトリーによって 2,4-DNPH の定量を行なった. その結果は次のとおりである.

3.2.1 セルロース薄層の紫外外部吸収スペクトル

C₂~C₁₄ の脂肪酸アルデヒドの各 2,4-DNPH はベンゼン溶液として紫外外部吸収スペクトルを測定すると, Fig.

Fig. 3 Chromatogram of 2,4-DNPH of n -alkanals on Kieselguhr G layer

4 の曲線 (a) のように 358 $m\mu$ に吸収極大を有する吸収曲線となる³⁾. しかしセルロース薄層上の各 2,4-DNPH のスポットは Fig. 4 曲線 (b) のように 374 $m\mu$ に吸収極大を持つことがわかった (島津自記紫外分光光度計 SV-50AL 型使用). これに溶液状態と固相状態と

Fig. 4 Absorption spectrum of 2,4-DNPH

a : In benzene solution ; b : On cellulose powder layer

の違いによると推察される。

以下デンストメトリーにはこの波長 (374 m μ) を採用した。

3.2.2 デンストグラムによる分離結果の良否判定

展開した薄層をフィルム状のクロマトストリップとして、デンストグラムを得ることができる。その1例として良好な分離を示す MAT 系 {Fig. 5 (A)} と、やや不完全な分離を示す MT 系 {Fig. 5 (B)} の各デンストグラムを Fig. 5 に示す。

Fig. 5 Densitograms of 2,4-DNPH on cellulose layer

Mobile phase : (A) MAT system, (B) MT system

Fig. 5 (A) および (B) からわかるように、デンストグラムを作製すると、その分離の良否をスポットの肉眼観察に比べていっそう確実に判定することができる。

3.2.3 アルデヒドの組成分析 種々のアルデヒドの混合組成のものについて、展開後のデンストグラムを作製すると、存在する 2,4-DNPH のモル数によってピーク面積が変化する。そこで各種の既知混合試料溶液について組成分析を試みた。

混合試料は次のように調製した。すなわち C₂, C₄, C₆, C₁₀ のアルデヒドをそれぞれ 5~20 mg はかりとり、これを 1 ml のベンゼンに溶解して任意の配合割合を持つ混合溶液を調製したのち、この 0.5 μ l をマイクロピペットでセルロース薄層に付着させ、TLC を行なった。

得られた薄層はフィルム状のクロマトストリップとし、デンストメトリーによって Fig. 5 のようなデンストグラムを得る。デンストグラム中の各スポットのピーク面積はそれぞれ (ピーク高さ×底辺)/2 で測定した。

このようにそれぞれ異なった四つの混合試料についてピーク面積を求め、既知配合割合との比較を行なった結果を Table III に示す。

Table III より明らかなように、デンストグラムの各ピーク面積比は、溶液中の各 2,4-DNPH 存在量比に比例し、1~3% の平均誤差で組成分析が可能となることがわかる。

Table III Relationship between weight and peak area from densitogram of 2,4-DNPH of *n*-alkanals

Run	Chain length	Sample taken		Peak area		Mean errors $\Sigma (A-B)/4$ (%)
		in μ g	mol% (A)	in mm ²	(B) area ratio %	
1	C ₂	2.80	31.0	4.30	31.2	1.0
	C ₄	2.76	26.3	3.70	26.8	
	C ₆	2.72	24.2	3.03	22.0	
	C ₁₀	2.62	18.6	2.73	19.8	
2	C ₂	2.88	39.8	4.45	36.2	2.8
	C ₄	1.38	17.1	2.52	20.4	
	C ₆	2.72	31.0	3.55	28.9	
	C ₁₀	1.31	12.1	1.75	14.3	
3	C ₂	1.44	21.3	4.68	24.6	1.8
	C ₄	2.76	36.2	6.95	36.4	
	C ₆	1.36	16.7	3.19	16.7	
	C ₁₀	2.62	25.8	4.25	22.3	
4	C ₂	1.44	22.4	5.44	24.2	1.3
	C ₄	1.38	19.2	4.52	20.2	
	C ₆	1.36	17.5	4.05	18.0	
	C ₁₀	3.93	40.0	9.45	42.0	

4 総 括

脂肪族 アルデヒド類を 2,4-DNPH として逆相分配 TLC により分離したのち、2,4-DNPH の特性波長 (374 m μ) でデンストメトリーによる組成分析を行なった。

分離のみの目的には Kieselguhr G-テトラリン固定相に MAT 展開系を用いた場合が良好な結果を与えた。この場合 C₂~C₁₄ の炭素数のアルデヒド 10 種がそれぞれ分離できる。

デンストメトリーは、セルロース粉末-テトラリン固定相に MAT 展開系を用いて分離したのち、塩化ビニルでセルロース薄層をフィルム化して、ガラス板からはがし取り、クロマトストリップを 374 m μ の波長で付属装置つき分光光度計を用い吸光度を測定する。

得られたデンストグラムのピーク面積比から、試料アルデヒドの組成分析ができる。この方法によるアルデヒド

ト分析の平均誤差は 1~3% であった。

(昭和 43 年 10 月 17 日, 日本化学会東
海支部分析化学研究発表会において講演)

文 献

- 1) 丸田銓二郎, 鈴木義仁: 工化, **61**, 1141 (1958).
- 2) 鈴木義仁, 武内次夫, 丸田銓二郎: 同上, **67**, 301 (1964).
- 3) 丸田銓二郎, 鈴木義仁: 同上, **64**, 2129 (1961).
- 4) 武内次夫, 鈴木義仁: 同上, **66**, 1578 (1963).
- 5) 尾上慶吾: 日化, **73**, 337 (1952).
- 6) 石川正幸, 古谷 力, 原 昭二, 中沢泰男: “薄層クロマトグラフィー”, 3 版, p. 205 (1968), (南山堂).
- 7) E. Stahl: “Dünnschicht-Chromatographie”, 2 Aufl., S. 213 (1968), (Springer Verlag, Berlin).
- 8) H. T. Badings, J. G. Wassink: *Neth. Milk Dairy J.*, **17**, 132 (1963).
- 9) G. Urbach: *J. Chromatog.*, **12**, 196 (1963).
- 10) H. Reich, S. J. Sanfilippo, K. F. Crane: *J. Biol. Chem.*, **198**, 713 (1952).
- 11) 武内次夫, 鈴木義仁, 山崎 豊: 本誌, **18**, 459 (1969).

☆

Separation and densitometric determination of 2,4-dinitrophenylhydrazones of aliphatic aldehydes by thin-layer chromatography. (Thin-layer chromatography of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds. I.) Tsugio TAKEUCHI, Yoshihito SUZUKI* and Yutaka YAMAZAKI** (*Department of Synthetic Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya

University, Chikusa-ku, Nagoya-shi; **Department of Chemistry, Faculty of Education, Kanazawa University, Marunouchi, Kanazawa-shi)

Separation and densitometric determination of 2,4-dinitrophenylhydrazones (2,4-DNPH) of aliphatic aldehydes ($C_2 \sim C_{14}$) were studied by reversed phase thin-layer chromatography (TLC) employing cellulose powder or Kieselguhr G as the adsorbent.

Mixture of cellulose powder (or Kieselguhr G) and water was applied to glass plates with a Stahl type spreader set at 0.25 mm thickness. The plates were air-dried for 24 hr., and then impregnated with tetralin by dipping them into solution of 5% tetralin in ether. After the application of samples, the plates were treated by ascending method with 90% methanol-acetic acid-tetralin (10:1:1, v/v/v) as mobile phase. Yellow spots of 2,4-DNPH in series were separated clearly.

$R_{fst}(=R_f/R_f \text{ of } C_6)$ values on Kieselguhr G layer were as follows: C_2 1.64, C_3 1.50, C_4 1.34, C_5 1.25, C_6 1.00, C_7 0.86, C_8 0.70, C_{10} 0.50, C_{12} 0.41, C_{14} 0.36. (R_{fst} values on cellulose layer are very close to those on Kieselguhr G.)

For the application to densitometry, the developed cellulose layers were imbedded in plastic film by dipping them into solution of 4% polyvinyl chloride in tetrahydrofurane. The film were peeled off from glass plates and cut into chromatostrips of 20 mm width.

Spots on strips were measured by spectrophotometer with special attachment for densitometry (wavelength 374 m μ , slit size 0.6 $\times$ 5 mm). Component analysis of aldehydes contained in sample solutions were carried out by the densitometry.

(Received Dec. 14, 1968)

☆

☆