3,4,5,6-テトラクロロフルオレスセイン水銀化合物を用いる チオ尿素あるいは塩化セチルピリジニウムのけい光光度定量*

森 逸 男**

(1973 年 11 月 10 日受理)

3,4,5,6-テトラクロロフルオレスセイントトラセトオキシ水銀化合物 (3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄) はチオ尿素あるいは塩化セチルピリジニウム (CPC) などと反応して赤色呈色体を生成するとともに, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄ 液のけい光を減少させるので, 新たに 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄ を用いるチオ尿素, あるいは CPC のけい光光度定量法について検討した. その結果 pH 8.9 でチオ尿素に $1.0 \times 10^{-4} M$ 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄ を加えて得た呈色体, あるいは pH 6.95 で CPC に 1.0% ポリビニルピロリドン (PVP) 液 1.0 ml および $1.25 \times 10^{-5} M$ 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄ を加えて得た呈色体の 555 nm におけるけい光を, 水銀ランプを光源として 365 nm の励起波長を用いて測定することにより 0~19.5 $\mu g/10 ml$ チオ尿素あるいは 0.15~1.0 $\mu g/10 ml$ CPC を感度よくけい光光度定量することができた.

1 緒 言

最近, フルオレスセイン水銀化合物 (Fl.Hg₄) を用いた大気中の S²⁻¹⁾, 赤りん中の S²⁻²⁾, あるいはプロテイン, プリンなどの分析法³⁾⁴⁾ などについて報告されている. 著者は Fl.Hg₄ にまさる試薬の合成とその利用を目的として新たに 2',4'-ジクロロフルオレスセイン⁵⁾ の水銀化合物 (2',4'-D.Cl.Fl.Hg₂), 2',7'-ジクロロフルオレスセイン⁶⁾ の水銀化合物 (2',7'-D.Cl.Fl.Hg₂) ならびに 3,4,5,6-テトラクロロフルオレスセインの水銀化合物 (3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄) を合成してチオ尿素あるいは陽イオン性界面活性剤の塩化セチルピリジニウム (CPC) への利用を検討した. その結果, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄ をチオ尿素, あるいは CPC などに用いた場合最も鮮明な呈色体を生成するとともに, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄ 液とそのチオ尿素, あるいは CPC 液とのけい光強度の差が大で, 0~19.5 $\mu g/10 ml$ チオ尿素, あるいは 0.15~1.0 $\mu g/10 ml$ CPC のけい光光度定量に利用できることを認めた.

2 試薬および装置

2.1 試 薬

Fl 誘導体の水銀化合物溶液: Fl(HgOCOCH₃)₄ 171.0 mg, 3,4,5,6-T.Cl.Fl(HgOCOCH₃)₄ 188.1 mg, 2',4'-D.Cl.Fl(HgOCOCH₃)₂ および 2',7'-D.Cl.Fl(HgOCOCH₃)₂ 114.8 mg を 1N 水酸化ナトリウム 1.0 ml に溶解したのち, 水を加えて全量 250 ml の $5.0 \times 10^{-4} M$ 液として用いた.

チオ尿素誘導体の溶液: チオ尿素, ジトリルチオ尿素, ジフェニルチオ尿素, フェニルチオ尿素, チオアセトアミド, チオセミカルバジドなどの $5.0 \times 10^{-4} M$ 水溶液またはメタノール液を調製して用いた.

CPC 溶液: $1.0 \times 10^{-2} M$ CPC の 20% メタノール液より適宜水を加えて $5 \times 10^{-4} M$ 液として用いた.

Grote 試液⁶⁾⁷⁾: ニトロプルシドナトリウム 0.5 g と塩酸ヒドロキシルアミン 0.5 g を水 10 ml に溶解後, 炭酸水素ナトリウム 1.0 g と臭素水 2 滴を加え, 水を加えて全量 25.0 ml とする.

ポリビニルピロリドン (PVP) 溶液: PVP(K=30) の 1.0% 水溶液を調製して用いた.

緩衝溶液: Sørensen のほう砂-水酸化ナトリウム液 (pH 8.9) および, ほう砂-塩酸液 (pH 6.95) を調製して用いた.

なお, 試薬はすべて特級品を用い, 水は再蒸留水を用いた.

* ハイドロキシフルオランおよびその誘導体の有機試薬としての利用研究 (第 15 報). 前報は森 逸男: 薬誌, 92, 246 (1972)

** 大阪薬科大学: 大阪府松原市河合 2-10-65

2.2 装 置

けい光スペクトルおよびけい光の測定：けい光スペクトルの測定には日立 MPF-2A 型分光けい光光度計で光源にキセノンランプを、またけい光の測定には日立 203 型分光けい光光度計で光源に水銀ランプを用い、それぞれ層長 10 mm の石英製セルを用いた。

pH の測定：日立堀場 M5 型および東亜電波 HM5A 型ガラス電極 pH メーターを用いた。

3 定量操作

3.1 チオ尿素

19.5 μg 以下のチオ尿素の溶液に緩衝液 (pH 8.9) 2.0 ml, $5.0 \times 10^{-4} M$ 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液 2.0 ml を加え、ついで水を加えて全量 10.0 ml とする。別にチオ尿素を除いて同じように処理して得た 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液とともに 20~35°C で 30 分間静置したのち、水銀ランプを光源として 365 nm の励起波長を用いて、3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液と 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄-チオ尿素溶液とのけい光強度の差を 555 nm で測定する。ついであらかじめ作成して得た 0~19.5 $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ チオ尿素の検量線よりチオ尿素濃度を求める。

3.2 塩化セチルピリジニウム

1.0 μg 以下の CPC を含む溶液に 1.0% PVP 液 1.0 ml, 緩衝液 (pH 6.95) 2.0 ml および $5.0 \times 10^{-4} M$ 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液 0.25 ml を加え、ついで水を加えて全量 10.0 ml とする。別に CPC のみ除いて同じように処理して得た 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液とともに 20~35°C で約 10 分間静置する。ついで水銀ランプを光源とする 365 nm の励起波長を用いて 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液と 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄-CPC 液との 555 nm でのけい光強度の差を測定し、あらかじめ作成して得た 0.15~1.0 $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ CPC の検量線より CPC 濃度を求める。

4 定量操作の検討

4.1 FI 誘導体の水銀化合物の合成

2', 7'-D.Cl.FI の水銀化反応⁸⁾を参考として FI, 2',

7'-D.Cl.FI, 2', 4'-D.Cl.FI あるいは 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI のそれぞれ 2.0 g を 5% 水酸化ナトリウム液 5.0 ml に溶解し、不溶物質を汙別したのち、酢酸第二水銀 7.0 g の酢酸溶液を加える。ついで 30% 酢酸および 1N 水酸化ナトリウムを用いて液性を pH 5~6 に調整後、水を加えて全量をほぼ 250 ml とし、95~100°C で約 10 時間加熱かき混ぜた。反応終了後、30% 酢酸を加えて得た水銀化合物を 5% 水酸化ナトリウムおよび 30% 酢酸を用いて再沈殿処理し、じゅうぶんに水洗したのち風乾する。これら FI 誘導体の水銀化合物は PPC 展開 (展開溶媒に 10% フェノール : 1N 水酸化ナトリウム : 水 = 1 : 2 : 7, 東洋汙紙 No. 50, 原点 5.0 cm を用いる上昇法) の結果、および水銀ならびに塩素の定量結果より、それぞれ FI(HgOCOCH₃)₄, 2', 4'-D.Cl.FI(HgOCOCH₃)₂, 2', 7'-D.Cl.FI(HgOCOCH₃)₂ および 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI(HgOCOCH₃)₄ と推定される。

4.2 チオ尿素誘導体と FI 誘導体の水銀化合物との反応

FI 誘導体の水銀化合物、特に 3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg₄ 液はチオ尿素、ジトリルチオ尿素、ジフェニルチオ尿素、フェニルチオ尿素、チオアセトアミドあるいはチオセミカルバジドなどのチオカルボニル化合物と反応して赤色呈色体を生成し、FI.Hg₄ を用いた場合に比べて呈色が安定、鋭敏で、Grote 試液を用いた場合⁶⁾⁷⁾ に比べ、ほぼ数倍の感度を示した。なお、Table II にこれら FI 誘導体の水銀化合物とチオ尿素誘導体との試験管内での検出限界値とその呈色を示した。以下、試薬の濃度は最終濃度で表示するものとし、pH 8.9 の液性調整には Sørensen のほう砂-水酸化ナトリウム液 (pH 8.9) 2.0 ml を、pH 6.95 の液性調整には同じくほう砂-塩酸液 (pH 6.95) 2.0 ml を加えて、最終容積を 10.0 ml とした。

4.3 けい光スペクトル

最終濃度 $5.0 \times 10^{-5} M$ FI 誘導体の水銀化合物と、そ

Table I Properties of FI. derivatives of Hg compounds

FI. deriv. Hg compounds	Color of		P.P.C.		Analysis of			
	Appearance	NaOH soln.	Color of spot	R_f	Hg %		Cl %	
					Calcd.	Found	Calcd.	Found
FI.Hg ₄	rd Or	y Or	p Rd	0.09	58.72	57.49	—	—
2', 4'-D.Cl.FI.Hg ₂	Rd	Or	rd P	0.11	43.83	43.51	7.73	7.42
2', 7'-D.Cl.FI.Hg ₂	Rd	Or	p Or	0.15	43.83	43.97	7.73	7.77
3, 4, 5, 6-T.Cl.FI.Hg ₄	Rd	rd Or	P	0.12	53.19	54.00	9.41	9.58

Developing solvent : 10% phenol 1 : 1N NaOH 2 : H₂O 7; rd : Reddish; y : Yellowish; p : Pinkish; Or : Orange; Rd : red; P : Pink

Table II Detection limits of thiourea derivatives by Fl. derivatives Hg compounds

Thiourea deriv.	Fl. Hg ₄		2', 4'-D. Cl. Fl. Hg ₂		2', 7'-D. Cl. Fl. Hg ₂		3, 4, 5, 6-T. Cl. Fl. Hg ₄	
	color	μg/ml	color	μg/ml	color	μg/ml	color	μg/ml
—	y Or	—	Or	—	or Y	—	p Or	—
Thiourea	rd P	0.23	rd P	0.09	p Or	0.40	P	0.06
Ditolythiourea	p Or	0.76	P	0.42	p Or	0.85	P	0.45
Diphenylthiourea	p Or	0.68	rd P	0.38	p Or	0.76	P	0.45
Phenylthiourea	P	0.46	rd P	0.20	or Y	0.76	P	0.30
Thioacetamide	P	0.23	rd P	0.09	p Or	0.46	rd P	0.06
Thiosemicarbazide	p Or	0.18	P	0.09	p Or	0.27	v Rd	0.09

Fl. deriv. Hg compounds : $1.0 \times 10^{-5} M$; pH : 8.9; or : Orangeish; p : Pinkish; rd : Reddish; v : Violetish; y : Yellowish;
P : Pink; Or : Orange; Rd : Red; Y : Yellow

のチオ尿素溶液,あるいはCPC溶液とのけい光強度の差を測定したところ,Table IIIに見られるように,いずれも3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄液を用いたとき,最もけい光強度の差が大で,その呈色体も比較的安定である。したがって以下チオ尿素あるいはCPCのけい光光度定量に3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄を用いることとした。

Table III Difference of fluorescence intensity of Fl. derivatives Hg compounds and it's thiourea or it's CPC solution

Fl. deriv. Hg compounds	Emission, wavelength (nm)	Difference of fluorescence intensity (%)	
		Thiourea (pH 8.9)	CPC (pH 6.9)
Fl.Hg ₄	540	21.2	26.3
2', 4'-D. Cl. Fl. Hg ₂	540	24.7	16.8
2', 7'-D. Cl. Fl. Hg ₂	540	18.5	38.8
3, 4, 5, 6-T. Cl. Fl. Hg ₄	555	30.4	60.4

Fl. deriv. Hg compounds : $5.0 \times 10^{-5} M$; CPC, or thiourea taken : $1.25 \times 10^{-5} M$; Excitation wavelength : 365 nm

Fig. 1にpH 8.9における365 nmを励起波長とする $5.0 \times 10^{-5} M$ のFl誘導体の水銀化合物の溶液のけい光スペクトルを示した。

4.4 液性の影響

pHの変化による3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄液と3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-チオ尿素,あるいはCPC溶液とのけい光強度の差は,それぞれSørensenの0.05Mほう砂-0.1N水酸化ナトリウム液2.0 mlを用いるpH 8.5~9.4,および0.05Mほう砂-0.1N塩酸液2.0 mlを用いるpH 6.7~7.2においてほぼ一定値が得られた。

4.5 けい光の安定性

3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄液とそのチオ尿素液,あるいはCPC溶液についてけい光の安定性を求めたところ,

Fig. 1 Emission spectra of Fl.Hg₄, 2', 4'-D. Cl. Fl. Hg₂, 2', 7'-D. Cl. Fl. Hg₂ and 3, 4, 5, 6-T. Cl. Fl. Hg₄ soln. at pH 8.9

Fl.Hg₄, Cl.Fl.Hg : $5.0 \times 10^{-5} M$; Excitation wavelength : 365 nm; — Fl.Hg₄; --- 2', 4'-D. Cl. Fl. Hg₂; —○— 2', 7'-D. Cl. Fl. Hg₂; ---- 3, 4, 5, 6-T. Cl. Fl. Hg₄

20~35°Cで30分間,あるいは10分間静置するとき,ほぼ一定のけい光強度の差が得られた。

なお,3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC液は比較的不安定であるが,1.0% PVP液1.0 mlを添加することにより安定化することができ,60°C以下であればほとんど温度の影響を受けない。

4.6 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄濃度の影響

$1.25 \times 10^{-5} M$ チオ尿素,あるいは $2.5 \times 10^{-5} M$ CPC

Fig. 2 Effect of pH

—○— 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-thiourea, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄: $1.0 \times 10^{-4} M$, thiourea: $1.25 \times 10^{-5} M$; —×— 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄: $2.5 \times 10^{-5} M$, CPC: $1.25 \times 10^{-5} M$, PVP: 1.0 ml; Excitation wavelength: 365 nm

Fig. 4 Calibration curve for thiourea

3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄: $1.0 \times 10^{-4} M$; pH: 8.9; Excitation wavelength: 365 nm

Fig. 3 Stability of 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-thiourea and 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC soln.

—○— 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-thiourea, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄: $1.0 \times 10^{-4} M$, thiourea: $1.0 \times 10^{-5} M$, pH: 8.9; —×— 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC, 3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄: $2.5 \times 10^{-5} M$, CPC: $1.25 \times 10^{-5} M$, PVP: 1.0 ml, pH: 6.95; Excitation wavelength: 365 nm

Fig. 5 Calibration curve for CPC

3,4,5,6-T.Cl.Fl.Hg₄: $1.25 \times 10^{-5} M$; PVP: 1.0 ml; pH: 6.95; Excitation wavelength: 365 nm

に対する 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ 液濃度の影響について検討したところ、チオ尿素に対して 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ を $8.75 \times 10^{-5} M$ 以上、また CPC に対して $1.25 \times 10^{-5} M$ 以上を添加するとき、けい光強度の差の測定に際しじゅうぶんな値を示した。したがって以下、チオ尿素の定量に $1.0 \times 10^{-4} M$ の 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ 液を、また CPC の定量に $1.25 \times 10^{-5} M$ の 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ 液を用いることとした。

4.7 検量線の作成

3 の定量操作に従ってチオ尿素、ならびに CPC の検量線を作成したところ、Fig. 4 および Fig. 5 に見られるように 0~19.5 $\mu g/10 ml$ チオ尿素、ならびに 0.15~1.0 $\mu g/10 ml$ CPC の濃度範囲においてはほぼ直線性を示した。

4.8 共存物質の影響

3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ を用いるチオ尿素あるいは CPC のけい光光度定量法においてチオカルボニル化合物、NH₄⁺、S₂O₃²⁻、S²⁻ などの共存、ならびに過剰の金属イオンの共存は正の誤差を示して妨害する。なお、 $5.0 \times 10^{-4} M$ 以下の EDTA、IDA あるいは 1, 10-フェナントロリンなどの共存はほとんどチオ尿素、CPC のけい光光度定量を妨害しないので金属イオンのマスク剤として用いることができる。

Table IV Effects of foreign ions

Foreign ions	Added as	Added ($\times 10^{-5} M$)	Difference of fluorescence intensity (%)	
			Thiourea	CPC
—	—	—	32.0	57.6
Th(IV)	nitrate	1.25	65.5	81.6
Al(III)	nitrate	1.25	77.5	96.8
Cd(II)	nitrate	1.25	58.3	76.9
Bi(III)	nitrate	1.25	60.5	75.1
Ge(IV)	chloride	1.25	54.2	50.5
MoO ₄ ²⁻	sodium	1.25	42.6	64.6
VO ₃ ⁻	ammonium	1.25	53.9	71.7
EDTA	sodium	5.0	32.5	57.8
IDA	sodium	5.0	32.4	57.9
phen	—	5.0	32.5	57.8

Thiourea—Thiourea taken : 6.5 μg , 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ : $1.0 \times 10^{-4} M$, pH : 8.9; CPC—CPC taken : 0.8 μg , 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ : $1.25 \times 10^{-5} M$, pH : 6.95

5 結果および考察

3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ を用いるチオ尿素、あるいは CPC のけい光光度定量法はチオ尿素に混在する尿素の

影響をほとんどうけず、その呈色も鮮明かつ比較的安定で定量感度も高いなどの利点を有する。また過剰に共存する金属イオンの影響は EDTA、IDA などの錯化剤の添加でほとんどマスクすることができる。なお、3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ を用いた CPC のけい光光度定量法はさきの CPC の吸光光度定量法⁹⁾ に比べて、約 20~30 倍の定量感度を有する迅速簡便な定量法である。

終わりに、本研究に対しご指導賜った京都大学薬学部宇野豊三教授に深謝します。また実験の一部に協力された本学小山 良君に感謝します。

(1972 年 4 月, 1973 年 4 月, 日本薬学会第 92 年, 93 年 会において発表)

文 献

- 1) M. Wronski : *Chem. anal.*, **14**, 29 (1968); *Anal. Abstr.*, **18**, 4250 (1970).
- 2) V. S. Yanashova : *Zavodsk. Lab.*, **30**, 23 (1964); *Anal. Abstr.*, **12**, 1688 (1965).
- 3) M. Wronski : *Chem. anal.*, **13**, 737 (1968).
- 4) C. Geroge, H. Marhta, F. Henry : *Talanta*, **17**, 273 (1970).
- 5) 森 逸男 : 薬誌, **85**, 481 (1965).
- 6) 赤塚政美, 天本宏太郎, 吉永節洋 : 本誌, **19**, 1427 (1970).
- 7) L. C. Chesler : *J. Bio. Chem.*, **152**, 571 (1944).
- 8) 大野武男, 森 逸男 : 岐阜薬大, **17**, 83 (1967).
- 9) 森 逸男, 小山 良 : 日本薬学会第 92 年 会講演要旨, IV, p. 102 (1972).

☆

Fluorophotometric determination of thiourea and cetylpyridinium chloride with 3,4,5,6-tetra-chlorofluorescein mercury compound. Itsuo MORI (Osaka College of Pharmacy, 2-10-65, Kawai, Matsubara-shi, Osaka)

A highly sensitive and brief fluorophotometric determination for minute amounts of thiourea and cetylpyridinium chloride(CPC) was carried out using 2', 4', 5', 7'-tetrakis (acetoxymcuri) fluorescein(Fl.Hg₄), 5', 7'-bis (acetoxymcuri)-2', 4'-dichlorofluorescein (2', 4'-D.Cl.Fl.Hg₂), 4', 5'-bis (acetoxymcuri)-2', 7'-dichlorofluorescein (2', 7'-D.Cl.Fl.Hg₂) and 2', 4', 5', 7'-tetrakis (acetoxymcuri)-3, 4, 5, 6-tetrachlorofluorescein (3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄) as the reagents. Among these mercurichlorofluorescein compounds, 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ produced a very stable and red colored formation with thiourea or CPC solution and showed a marked decrease in its fluorescence intensity, which was applied to the fluorophotometric determination of thiourea and CPC. The fluorescence intensity of 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄-thiourea solution was constant over the pH range of 8.5 to 9.4 adjusting with Na₂B₄O₇-NaOH solution, and the fluorescence intensity of 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC solution was constant over the pH range of 6.7 to 7.2 adjusting with Na₂B₄O₇-HCl buffer solution. The maximum emission wavelength of difference in fluorescence intensity between 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ solution and 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄-

thiourea or 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC solution were about 555 nm. The calibration curves were linear in the range of 0 to 19.5 μ g/10 ml thiourea and 0.15 to 1.0 μ g/10 ml CPC. The recommended fluorophotometric analytical procedures for thiourea and CPC are as follows:

Thiourea—A sample solution containing less than 19.5 μ g of thiourea is taken in a 10.0 ml measuring flask to which 2.0 ml of Sørensen buffer solution (pH 8.9) and 2.0 ml of 5.0×10^{-4} M 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ solution are added. The whole is made up to mark with distilled water, and the solution is kept at 20~35°C for 30 minutes, then the fluorescence intensities of 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ solution and 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄-thiourea solution are measured at 555 nm.

CPC—A sample solution containing less than 1.0 μ g of CPC is taken in a 10.0 ml measuring flask. 2.0 ml of Sørensen buffer solution (pH 6.95), 1.0 ml of 1.0% polyvinylpyrrolidone (PVP) solution and 0.25 ml of 5.0×10^{-4} M 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ solution are added. The whole is made up to the mark with distilled water, and the solution is kept at 20~35°C for 10 minutes, then the fluorescence intensities of 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄ solution and 3, 4, 5, 6-T.Cl.Fl.Hg₄-CPC solution are measured at 555 nm.

The effects of foreign ions on the fluorescence intensity of the colored formation were examined and shown in Table V. The reaction is quite sensitive, and the procedure does not require a long time.

(Received Nov. 10, 1973)

核磁気共鳴法によるクレゾール, トルイル酸および トルイジン 3 異性体の定量

安田 誠二, 垣山 仁夫*

(1973 年 11 月 27 日受理)

クレゾール, トルイル酸およびトルイジンのオルト, メタ, パラ異性体の定量を核磁気共鳴法によって行なった. クレゾール 0.5 g/ml の 2N 水酸化ナトリウム溶液, トルイル酸 0.5 g/ml の 4N 水酸化ナトリウム溶液, およびトルイジン 0.5 g/ml の 4N 塩酸溶液について, 各異性体のメチルピークを測定すると, ピークは鋭い単一線となり, 低磁場側からオルト, メタ, パラの順に分離した. 各メチルピークの分離は, クレゾールでオルト-メタ間 0.06 ppm, メタ-パラ間 0.05 ppm, トルイル酸でオルト-メタ間 0.18 ppm, メタ-パラ間 0.06 ppm, トルイジンでオルト-メタ間 0.12 ppm, メタ-パラ間 0.04 ppm であった. 分離したメチルピークの高さ比を測定することによって, 3%から 80% の間の各異性体を $\pm 1.3\%$ 以内の誤差で定量することができた.

1 緒 言

クレゾール異性体の分離定量法としては, 従来ガスクロマトグラフ法¹⁾ や紫外²⁾ および 赤外線吸収法³⁾ があり, トルイジンについては, ガスクロマトグラフ法⁴⁾ やペーパークロマトグラフ法⁵⁾ がある. また, トルイル酸の異性体の分離定量法についてはほとんど報告がない. 核磁気共鳴法による定量は, これらの定量法に比べて操作が簡単で, 直接非破壊に測定できるため, 各方面への応用が検討されている^{6)~13)}.

Mathias ら⁸⁾⁹⁾ は, ジニトロおよびジアミノトルエンの各異性体のメチルピークが重クロロホルム溶媒中で,

Gehring ら¹¹⁾¹²⁾ は, ジおよびトリニトロトルエンの異性体のメチルピークが重アセトン溶媒中で, それぞれ分離することから各異性体の定量分析を行なっている.

Fujiwara ら⁶⁾ は, メチルナフタレンの α および β 異性体のメチルピークが四塩化炭素溶媒を用いて測定すると分離することから, 2 異性体の定量を行なっている.

クレゾール, トルイル酸およびトルイジンのオルト, メタ, パラ異性体のメチルピークは, 通常の溶媒中で測定すると 1 本の鋭いピークとなるが, 単一溶媒中での各メチルピークの化学シフト差はきわめて小さい. 和井内ら⁷⁾ は, クレゾール異性体のメチルピークが水-メタノール混合溶媒中で分離することから, 各異性体の定量を行なっている.

* 九州工業技術試験所: 佐賀県鳥栖市宿町