アルキルトリフェニルホスホニウムイオンのろ紙電気泳動

蒔田 桂, 奥山 剛, 安藤 文雄, 額 鏡吾*

中部大学工学部応用化学科 (〒487-8501 春日井市松本町 1200)

Paper Electrophoresis of Alkyl Triphenylphosphonium Ions

Kei MAKITA, Takeshi OKUYAMA, Fumio ANDO, and Jugo KOKETSU*

Department of Applied Chemistry, College of Engineering, Chubu University (1200 Matsumoto, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan)

Received June 14, 2000 ; Accepted July 26, 2000

In order to use for separation and qualitative analysis of phosphonium ions, the paper electrophoresis was applied on the fourteen triphenylphosphonium ions which have the linear chain alkyl substituents from methyl to octyl groups on the phosphorus atom along with benzyl, acetylmethyl, benzoylmethyl, methoxycarbonylmethyl, ethoxycarbonylmethyl, cyanomethyl substituents. Good correlations have been found between the average mobilities and the molecular weights.

Key Words : Electrophoresis, Phosphonium Ions

1 緒 言

電場の下で荷電した溶質を移動させて物質を分離するゾーン電気泳動法のうち、ろ紙を支持材質として用いるろ紙電気泳動法はこれまで生体高分子であるタンパク質、DNA、糖類などの簡便な定性分析法として利用され、有機化合物におけるシリカゲル薄層クロマトグラフィーと似た幅広い役割を担ってきた¹⁻³⁾。近年になり、これら生体高分子分析においては寒天やポリアクリルアミドゲルを担体とするゲル電気泳動法⁴⁾やキャピラリー電気泳動法⁵⁾が正確な結果を与えることから、ろ紙電気泳動法が分析方法として応用されることは希となっているのが実状である。

しかし、ろ紙を用いる方法は手軽であり、適当な条件を選べば穏和な条件下、極めて高い分離能を示すことが知られていることから、近年においてもアミノ酸を含む窒素含有化合物⁶⁻¹⁰⁾やピリジニウムイオン¹¹⁾、フェノール^{12,13)}、金属イオン¹³⁻¹⁹⁾、リン酸誘導体²⁰⁻²²⁾、イオウ誘導体²³⁾などに応用された例が報告されている。しかしホスホニウムイオンのろ紙電気泳動法による分離についてはこれまで全く報告されていない。

ろ紙を用いる利点は、ゲルまたはキャピラリー電気泳動法において適切な発色反応が困難な物質についても、ろ紙上での化学反応を利用できることである。特に有機物質については、ゲル上に吸着した物質の検出は特有な化学反応を利用できる場合を除いて、一般に検出が困難であるのに反し、ろ紙上では最終的にはシリカゲル薄層クロマトグラフィーで応用される万能型のヨウ素蒸気に曝露し発色させることも可能であり、この検出が容易である利点を生かすことができると考えられる。

実験方法として、pHを一定にした緩衝液を媒体として、

一定の電圧下での電気泳動における泳動距離（以下ELと略す）を求め、基準試料の泳動距離に対する相対泳動距離を求めた。この相対泳動距離から得た相対易動度（以下ARMと略す）と分子量（以下MWと略す）との相関を検討した。

2 実 験

2.1 実験装置と実験材料

電気泳動はアドバンテック社製EF-200型ろ紙電気泳動装置を使用した。定電圧印加には株式会社マリソル社の高精度安定化電源装置MP-7612Dを用いた。電流計は内田洋行製ミリアンペア計TM-500を使用した。

³¹P-NMRは日本電子JNM-Aシリーズを用いてCDCl₃を溶媒として測定した。化学シフト (δ_{ppm}) は85%リン酸を基準とした。

質量スペクトルは直接試料導入装置を備えた電子科学株式会社製MS型検出器EMD-05Bを用いた。

ろ紙電気泳動にはToyo Roshi Kaisha Ltd製ADVANTEC 50番 (400×400 mm²) のろ紙を使用した。

2.2 反応試薬

本研究ではトリフェニルホスフィンに各種臭化アルキルを反応させて得られたホスホニウムイオンのろ紙電気泳動について検討した。これらのホスホニウムイオンはこれまで多く報告²³⁻²⁶⁾されているため、ここでは物性の詳細は省略するが、その構造は質量分析により各オニウムイオンの陽イオン部に相当するペアレントピークを検出したほか、Table 3に示した³¹P-NMRスペクトルデータにより確認した。各種置換基を有するホスホニウムイオンの略号は以下の通りである。臭化トリフェニルメチルホスホニウム（以下Meと略記する）、以下直鎖アルキル基を用いたエチル (Et)、プロピル

(Pr), ブチル (Bu), ペンチル (Pen), ヘキシル (Hex), ヘプチル (Hep), オクチル (Oct) のほか, ベンジル (Bn), アセチルメチル (Acm), ベンゾイルメチル (Bzm), メトキシカルボニルメチル (Mcm), エトキシカルボニルメチル (Ecm), シアノメチル (NCm) の各ホスホニウムイオンを合成し泳動に用いた. 緩衝液に用いたピリジン, ギ酸, 酢酸と, ホスホニウムイオンの検出に用いたブタノール, ニンヒドリン, ヨウ素は市販品をそのまま使用した.

泳動には次の2種類の pH を持つ緩衝液を使用した.

pH 1.9: ギ酸 5: 酢酸 15: 水 80 (体積)

pH 3.1: ピリジン 1: 酢酸 10: 水 89 (体積)

2.3 電気泳動法

すき目方向に長辺ができる様に $400 \times 150 \text{ mm}^2$ の大きさにろ紙を切断し, 上下 90 mm を残した中央部分に切り込みを入れて, 幅 18 mm の展開部が5列ある打ち抜きろ紙を作製した. このろ紙を所定の緩衝液に浸したのち, 泳動装置に装着した. 泳動装置に蓋をして15分間放置してろ紙上の湿潤状態を均一化した. あらかじめ同じ緩衝液に溶解したホスホニウムイオンの試料溶液 50 μl を, ピペットで陽極から 80 mm の位置に塗布した. 試料塗布後, 泳動装置に蓋をして5分放置したのち所定の電圧で泳動を開始した.

1時間の泳動後, ろ紙をはずし 120°C に設定した乾燥器で20分乾燥した. このろ紙をガラス容器に充満させたヨウ素蒸気に曝露する方法で発色させることを試みたが, 発色に適さない試料が散見されたため, タンパク質の発色に利用される2% ニンヒドリン-水飽和ブタノール溶液を噴霧し, 風乾後20分 120°C にて乾燥する事により青紫色に発色することを確認した. 以後この発色法を用いて泳動位置を検出した.

泳動距離は泳動時の温度などの差異により変動する可能性があるため, エチルトリフェニルホスホニウムイオン (Et) を基準物質に選び, この泳動距離を基準として他のホスホニウムイオンの泳動距離との比を用いた. 1種類の試料につきこの分析を5回繰り返し, その平均値を取って比較検討した.

3 実験結果

3.1 泳動電圧と緩衝液の pH が泳動距離に及ぼす影響

Table 1 に Et と Ecm の試料を pH 3.1 の緩衝液を用いて泳動電圧を 200, 400, 600 V に設定し, 1時間泳動した泳動距離 (EL mm) を示す. 3回測定した標準偏差 (SD) は比較的小さく, 泳動距離の平均値 (AEL mm) は印加した電圧 V にほぼ正比例することが分かった.

Table 1 Effect of the input electric voltage on the electrophoresis mobility (EL and AEL).

Phosphonium Ion	Voltage [V]	EL1 [mm]	EL2 [mm]	EL3 [mm]	AEL [mm]	SD
Ph ₃ P ⁺ Et (Et)	200	29.9	28.6	30.1	29.5	0.814
	400	65.9	66.3	66.8	66.3	0.451
	600	101.5	102.3	99.5	101.1	1.442
Ph ₃ P ⁺ CH ₂ CO ₂ Et (Ecm)	200	28.9	29.4	29.0	29.1	0.227
	400	65.2	64.0	63.9	64.4	0.739
	600	99.6	97.7	98.5	98.6	1.001

Table 2 Effect of the pH of buffer solutions on the electrophoresis mobility (EL and AEL) of Ph₃P⁺Et (Et).

pH	EL1 [mm]	EL2 [mm]	EL3 [mm]	AEL [mm]	SD
1.9	99.6	100.3	101.5	100.5	0.96
3.1	101.5	102.3	99.5	101.1	1.44

Table 3 ³¹P-NMR chemical shifts and average relative mobility (ARM) of alkyl triphenylphosphonium ions at pH 1.9 and 3.1.

R	δ_P [ppm]	pH = 1.9		pH = 3.1	
		ARM	SD	ARM	SD
Me	22.57	1.034	0.037	1.002	0.021
Et	27.24	1.000		1.000	
Pr	24.88	0.978	0.016	0.972	0.029
Bu	27.02	0.950	0.014	0.959	0.014
Pen	25.41	0.945	0.012	0.953	0.005
Hex	24.77	0.944	0.011	0.948	0.007
Hep	24.97	0.937	0.006	0.935	0.007
Oct	24.83	0.926	0.004	0.930	0.009
Bn	23.84	0.922	0.025	0.943	0.016
Acm	20.47	0.977	0.008	0.981	0.013
Bzm	22.59	0.908	0.009	0.927	0.013
Mcm	21.44	0.964	0.017	0.972	0.009
Ecm	21.57	0.961	0.006	0.965	0.005
NCm	22.41	0.976	0.003	0.996	0.021

また, Et を用いて pH 1.9 と 3.1 の場合の泳動距離を比較した結果を Table 2 に示す. 緩衝液の pH により泳動距離に大きな差異はない. またこの場合測定した電流値は泳動シート全体で 20~24 mA の間で変動したが, pH による電流値の違いは認められなかった.

3.2 各種置換基を有するホスホニウムイオンの電気泳動

上に述べた条件検討を基にして, 以下の泳動では pH 1.9 と 3.1 の緩衝液を用い, 印加電圧 600 V で1時間の泳動を行った. Table 3 には同じ試料に対し, pH 1.9 と 3.1 の緩衝液を用いて5回の泳動を試みた場合の, エチルトリフェニルホ

Fig. 1 Dependence of average relative mobility (ARM) on the molecular weight (MW).

スホニウムイオンの泳動距離 (EL_{Et}) に対する相対的な値である易動度 (EL_R/EL_{Et}) の5回の平均易動度 (ARM) を示した。各測定標準偏差 (SD) は小さく精度は高い。

さらに分子量 (MW) と ARM の相関関係を Fig. 1 に示す。

4 考 察

有機リン化合物の定性分析には、一般的なクロマトグラフィーやスペクトルによる分析方法が適用でき応用されてきた²⁵⁾。しかし、ホスホニウムイオンのろ紙電気泳動法を用いた検出については全く報告がなされていない。本実験では各種ホスホニウムイオンを合成し、それらのろ紙電気泳動法の易動度を求め、分子量との相関を検討した。

ホスホニウムイオンのろ紙上での検出にはニンヒドリン-ブタノール溶液が適応できる。この発色機構の詳細には明らかではないが、ニンヒドリンの加熱により生成する反応性の高いトリカルボニル基とカルボニル酸素への親和性の高いリン原子の反応生成物が発色物質を与えると考えられる。ニンヒドリンによる各スポットの発色は最初青紫色を示すが、時間の経過と共に褐色へと変化する。この発色は明瞭に識別可能でありホスホニウムイオンの種類などへの依存性は認められず、この方法がホスホニウムイオンの汎用的な検出法として適していると考えられる。

電気泳動は23℃の恒温に温度調節の可能な場所で行い、装置自体に温度調節機能は備えていない状態で行った。泳動の条件としては、pH 1.9のギ酸-酢酸と3.1のピリジン-酢酸系の緩衝液を用いた場合、泳動距離、泳動時の電流値に大きな差異は認められなかった。また、電圧変化の泳動距離への影響を求めたところ、Table 1に示すように600 V、1時間の条件が適当であることが判明した。電流値は20~24 mAで大きな変動はなく、ジュール熱の発生も泳動距離に影響を与えるほどのものではなかった。しかし泳動条件変化の影響を打ち消すため、標準物質としてエチルトリフェニルホスホニウムイオンの泳動を同じろ紙上で行い、この値を基準として相対的な泳動距離の平均値を用いて平均易動度 (ARM) を得た。この値はアルキル置換基の種類により変動し、構造変化の影響を受ける。この易動度と分子量との相関を検討した。分子の大きさを反映する分子量との相関は、

$$ARM = a \times (MW/10^3) + b$$

を用いると比例定数 a 、定数項 b と単相関係数 r および分散 s は次のように計算される。

$$\begin{aligned} \text{pH} = 1.9 : a &= -0.981 & b &= 1.29 \\ r &= 0.923 & s &= 0.012 \\ \text{pH} = 3.1 : a &= -0.869 & b &= 1.22 \\ r &= 0.937 & s &= 0.007 \end{aligned}$$

両 pH での単相関係数はいずれも良好であり s 値も小さく、有意の相関が存在する。また、相関の勾配が負となることは分子量が大きくなるほど電気泳動の易動度に対し抵抗として作用することを意味している。

これらの結果から、ろ紙電気泳動法を用いて易動度を比較することにより、分子の大きさの変化に基づく分離分析が可能であり、この電気泳動法がホスホニウムイオンの定性に有

効な手段であると考えられる。

5 結 論

- ろ紙上に展開したホスホニウムイオンの発色法としてニンヒドリン発色法が有効であることを見いだした。
- 14種類のホスホニウムイオンのろ紙電気泳動を行ったところ、ギ酸-酢酸およびピリジン-酢酸系緩衝液を用いることにより適切な相対易動度が求められた。
- この相対易動度と分子パラメーターとしての分子量と置換基全般に渡って良好な相関が成立した。

文 献

- R. J. Block, E. L. Durrum, and G. Zweig, *A Laboratory Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York (1955).
- L. P. Ribeiro, E. Matidieri, and O. R. Affonso, *Paper Electrophoresis*, Elsevier, London (1961).
- S. Fanali and L. Ossicini, *J. Chromatogr.*, **287**, 148 (1984).
- H. Terada, Denki Eidouhou, Kiso To Zikken, Hirokawa, Tokyo (1989), (in Japanese).
- S. Honda and S. Terabe, Kyapirari Denkieidou, Koudansya, Tokyo (1995), (in Japanese).
- A. R. Hayman and D. O. Gray, *J. Chromatogr.*, **370**, 194 (1986).
- R. L. Munier and S. Meunier, *Chromatographia*, **11**, 508 (1978).
- J. Franc and K. Pospisilova, *J. Chromatogr.*, **74**, 157 (1972).
- H. Wagner and H. Lehmann, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **283**, 115 (1977).
- Y. Kitaoka, *J. Chromatogr.*, **147**, 449 (1978).
- E. Bald, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **320**, 776 (1985).
- E. Bald, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **305**, 415 (1981).
- S. A. Navi, A. Sikarwar, and A. Gupta, *Acta Chromatogr.*, **8**, 162 (1998).
- N. M. Cvjetian and K. O. Jovanovi, *J. Chromatogr.*, **94**, 349 (1974).
- R. K. P. Singh, J. R. Yadava, P. C. Yadava, and K. L. Yadava, *Z. Phys. Chem.*, **264**, 464 (1983).
- A. K. Misra, R. P. S. Rajput, V. K. Maheshwari, and D. K. Misra, *J. Planar Chromatogr.*, **1990**, 256.
- J. C. Nasi and C. R. Tirapelli, *Rev. Bras. Farm.*, **77**, 173 (1996).
- V. Pop, G. Marcu, and A. Batar, *Rev. Chim. (Bucharest)*, **48**, 943 (1997).
- J. Maslowska and R. Sikorski, *Zesz. Nork.-Polytech. Lodz., Chem. Spozyw. Biotechnol.*, **60**, 19 (1998).
- H. Jensen, F. Habault, A. M. Lacoste, A. Cassaigne, and E. Neuzil, *J. Chromatogr.*, **132**, 556 (1977).
- R. C. Johnson, R. M. C. Dawson, and N. Freinkel, *J. Chromatogr.*, **187**, 235 (1980).
- L. Xu, H. Wang, and Q. Su, *Comput. Chem.*, **16**, 195 (1992).
- J. L. Frahn, *J. Chromatogr.*, **318**, 446 (1985).
- P. Beck, "Organic Phosphorus Compounds (Eds. G. M. Kosolapoff and L. Maier)" Wiley-Interscience, New York, Vol. 2, Chap. 2 (1972).
- R. Okazaki, Yuuki Rin Kagoubutsu (Ed. Yuuki Gousei Kagaku Kyokai) Gihoudou Tokyo, p.288 (1971), (in Japanese).
- Kinki Kagaku Kougyokai, Yuuki Kinzoku Handobukku (Organo Metallic Handbook), Asakura Syoten, Tokyo, p. 530 (1972), (in Japanese).