p-Dimethylaminobenzal Amine 類の螢光性とその応用
第一級アミン類のペーパークロマトグラフィーによる分離定量

中 西 愛

近畿大学薬学部¹⁾

Fluorescence of *p*-Dimethylaminobenzal Aromatic Amines,
and Its Application to Separation and
Determination of Some Amines by Paper Chromatography

AI NAKANISHI

Faculty of Pharmacy, Kinki University¹⁾

(Received March 11, 1968)

In order to determine primary aromatic amines, the characteristic fluorescences of the compounds obtained by the reaction of the several amines with *p*-dimethylaminobenzaldehyde were measured.

The concentration of *p*-dimethylaminobenzal *p*-chloroaniline and its relative fluorescence intensity showed a linearity. The relationship between Hammett's substituent constant of the substituents of the aromatic amines and relative fluorescence intensity of the benzalamine compounds of the amines was investigated.

The application of these observations to the micro-determination of aromatic amines was examined. Various types of aromatic primary amine were separated with paper chromatography and reacted with *p*-dimethylaminobenzaldehyde to form corresponding benzalamine compound, which was detected with ultraviolet lamp and determined in its quantity.

人口甘味剤である dulcin の毒性を検討する場合、その中に含まれる微量成分の効果を無視できないと思われるが、従来まで多量の dulcin 存在下における微量の *p*-phenetidine などの定量は困難と考えられ、この方面の研究は行なわれていない。さきに筆者は薬理試験用マウス飼料中の dulcin に共存する微量の *p*-phenetidine の定量法を検討した際、従来からアミン呈色試薬として用いられる *p*-dimethylaminobenzaldehyde^{2,3)} と *p*-phenetidine の結合体が塩酸酸性で可視部に螢光を発し、

その感度は発色法の 10—20 倍に達することを発見し、一方 dulcin は発色するが螢光を発しないことを利用して、まず大部分の dulcine を除去した後、ペーパークロマトグラフィーにより dulcin と *p*-phenetidine を分離し、希釈法で *p*-phenetidine のみを定量することが出来た。⁴⁾

今回はこの試薬による他の芳香族アミンの螢光発現の様子を溶液およびペーパ上で検索し、さらにペーパークロマトグラフィーによる微量のアミンの混合物の分離

1) Location: 321, Kowakae, Fuse-shi, Osaka (大阪府布施市小若江 321).

2) 一番ヶ瀬尚, 児島昭次, 薬誌, **82**, 1616 (1962).

3) 三郡, 小林, 第79回 日本薬学大会, 1959年.

4) 中西 愛, 近畿大学薬学部紀要, **5**, 7 (1967).

定量の可能性を追求する目的で実験を行なった。なお溶液中における芳香族アルデヒド類と芳香族アミンとの結合物の蛍光発現の機作については最近天野⁵⁾等の報告があるが、*p*-dimethylaminobenzaldehyde については触れておらず、また縮合物の性質も違がうと思われる。

実験の部

試料 *p*-Dimethylaminobenzal amine の合成

p-dimethylaminobenzaldehyde (以下 D.A.B.A. と略記) と芳香族一級アミン *p*-toluidine, *m*-toluidine, *p*-chloroaniline, *p*-anisidine, *m*-anisidine, aniline, *p*-phenetidine, *m*-aminobenzoic acid, *p*-aminobenzoic acid, *p*-nitroaniline, *m*-nitroaniline をエタノール中で当量ずつ反応させ、冷後析出する結晶をエタノールより再結晶精製する。各 *p*-dimethylaminobenzal amine の mp はつぎのごとくである。

p-dimethylaminobenzal-*p*-toluidine, 122°; *p*-dimethylaminobenzal-*m*-toluidine, 80°; *p*-dimethylaminobenzal-*p*-chloroaniline, 154°; *p*-dimethylaminobenzal-*p*-anisidine, 142°; *p*-dimethylaminobenzal-*m*-anisidine, 92°; *p*-dimethylaminobenzal-aniline, 100°; *p*-dimethylaminobenzal-*p*-phenetidine, 151°; *p*-dimethylaminobenzal-*m*-aminobenzoic acid, 200°; *p*-dimethylaminobenzal-*p*-aminobenzoic acid, 265°; *p*-dimethylaminobenzal-*p*-nitroaniline, 208°; *p*-dimethylaminobenzal-*m*-nitroaniline, 112°;

操作 1. 溶液の蛍光スペクトルおよび相対蛍光強度の測定

1) 蛍光スペクトル

さきに示した各 *p*-dimethylaminobenzal amine の 5×10^{-3} mole/liter 塩酸エタノール溶液 (塩酸濃度 3N) を調製、日立 E P V 2 A 型分光光度計に日立 G-2 型蛍光分光装置をとりつけ、励起光源にキセノンランプを用いて励起および蛍光スペクトルを測定した。

2) 検量線の作成

p-dimethylaminobenzal-*p*-chloroaniline と HCl のモル比をそれぞれに 1:1 および 1:4 になるようエタノール塩酸溶液に試料を溶解、試料の濃度範囲 1×10^{-5} — 1×10^{-4} Mole/liter について測定条件を一定にして励起波長 464m μ 、蛍光波長 496m μ で各々の蛍光強度を測定した。感度特性の補正は行なっていない。

3) 相対蛍光強度の測定

感度、スリット巾など測定条件を一定とし、D.A.B.A.-*p*-toluidine の 5×10^{-3} mole 塩酸エタノール溶液の極

大蛍光強度を 100 とし、各物質の相対強度を求めた。ただしこの場合、特に厳密性を要求しなかったので感度特性の補正を行っていない。

2. ペーパークロマトグラフィー

1) 蛍光発現の有無、およびその強度の測定

各アミンの 1 μ g/ml メタノール溶液をつくり、これを適当に希釈したものを 0.05ml 宛汙紙上 (No. 50 2 $\times$ 40 cm を長さ 10cm に切ったもの) にスポットし、D.A.B.A. 試薬 (*p*-dimethylaminobenzaldehyde 1g を特級塩酸 30ml にとかし全容を 100ml とする以下、D.A.B.A. 試薬と略記) をふん霧して風乾後、Sylvania 15w Black Blue (U.S.A.) ランプを用いて蛍光の有無を調べる。かつ溶媒として使用したメタノール同一量をスポットしたものと比較し、蛍光を認めうる限界モル数を求めた。

2) 単独および混合アミンの定量法

aniline, *p*-chloroaniline, *p*-phenetidine および *p*-aminobenzoic acid の 2.5—30 μ g/ml のメタノール溶液、および *p*-phenetidine と *p*-chloroaniline の混合溶液を用い、希釈法により蛍光消失スポット量を求める。展開溶媒、展開風乾条件、および検出法は以下に示すとおりである。

展開溶媒: (1) ブタノール—水—ギ酸 (10:10:1) 上層を使用 (*p*-chloroaniline, *p*-phenetidine) (2) 醋酸エチル—ギ酸—水 (4:1:2) (aniline) (3) メタノール—アミルアルコール—ベンゼン—水 (30.8:15.2:46:8) (*p*-aminobenzoic acid)。

展開条件および風乾: 東洋汙紙 No. 50 (2 $\times$ 40) 一次元上昇法。風乾は室温一時間。

Fluorescence excitation and emission

Fig. 1. Spectra of *p*-Dimethylaminobenzal-*p*-toluidine

A: excitation spectrum ($\lambda_{\max}$ 464m μ)

B: fluorescence spectrum ($\lambda_{\max}$ 506m μ)

5) 天野為之, 水上 聡, 薬誌, 85, 1035, 1042, 1049, (1965); 86, 2 (1966).

検出：D.A.B.A. 試薬を噴霧，20分後その蛍光を紫外線ランプで観察する。

結果と考察

1) 溶液の蛍光スペクトル

前記物質の塩酸エタノール液によって得られた励起および蛍光スペクトルの1例 (*p*-dimethylaminobenzal-*p*-toluidine) を Fig. 1 に示す。

また，TABLE I は，各化合物の最大励起および蛍光波長と，D.A.B.A.-*p*-toluidine を基準とした相対蛍光強度である。

TABLE I. Fluorescence Characteristics of *p*-Dimethylaminobenzal Amines

R	Hammett's substituent constant	C ₂ H ₅ OH + acid ^{d)}		RED ^{c)}
		EX. max ^{a)} mμ	Em. max ^{b)} mμ	
<i>p</i> -OCH ₃	-0.268	480	520	70.0
<i>p</i> -OC ₂ H ₅	-0.25	472	520	65.0
<i>p</i> -CH ₃	-0.170	464	506	100.0
H-	0	460	500	60.0
<i>m</i> -OCH ₃	-0.115	468	506	73.0
<i>p</i> -Cl	-0.227	468	506	73.0
<i>m</i> -CO ₂ H	-0.355	470	512	59.0
<i>p</i> -COCH ₃	-0.376	414	530	33.5
<i>m</i> -NO ₂	-0.710	416	506	32.0
<i>p</i> -CO ₂ H	-0.728	414	518	29.0
<i>p</i> -NO ₂	-0.778	406	512	20.0

a) fluorescence excitation maximum

b) fluorescence emission maximum

c) relative fluorescence intensities

d) 3N HCl酸性 EtOH

Fig. 2. Relationship between Relative Fluorescence Intensities of *p*-Dimethylaminobenzal Amines and Hammett's Substituent Constants σ of Substituted Groups of the Compounds

次に Fig. 2 はハメット定数と相対蛍光強度の関係を示し，電子供与性基の導入が蛍光強度を増大し，電子受容性基の導入はそれを減弱することがあきらかになった。

2) *p*-Dimethylaminobenzal-*p*-chloroaniline : HCl の濃度 1 : 1，および 1 : 4 の溶液につき試料濃度と蛍光強度の関係を調べた結果を Fig. 3 にしめす。

Fig. 3. Calibration Curves of *p*-Dimethylaminobenzal-*p*-chloroaniline

●..... 1 × 10⁻³N-HCl (EtOH solution)

○..... 4 × 10⁻³N-HCl (EtOH solution)

この結果，1 × 10⁻⁴mol/liter 以下の濃度において蛍光強度と試料濃度の間にほぼ直線関係が成立することを認めた。遊離アミンの定量を行なうため，過剰の *p*-dimethylaminobenzaldehyde を共存させて蛍光強度の測定を行なってみたが，この場合には再現性あるよい結果は得られなかった。

3) 各種アミン類のメタノール液を炉紙に浸し，1% D.A.B.A. 試液をふん霧，風乾して20分後の蛍光発現の有無を Sylvania 15w Black Blue (U.S.A) ランプ下で調べ，結果を TABLE II に示す。

また Fig. 4 は蛍光の発現を示した第一級アミンについて蛍光を認めうる限界モル数 (*m*) の逆数の対数とハメットの置換基定数との関係を図示したものであり，ろ紙上での実験では試薬と未反応のアミン類の残存などが危惧されたにもかかわらず蛍光発現の傾向は溶液におけると同様であり，その鋭敏度は溶液にくらべてはるかに高い点が注目される。

4) 紙蛍光法による定量分析

a. 精度の検討および検量線 *p*-Chloroaniline を用い実験精度を検討した結果を TABLE III にしめす. 数値は検出に可能な最小スポット量 *S* の値, および平均値標準偏差である. この結果からスポット量が適当であれば数回の繰りかえし実験を行なうことにより実用的な誤差の範囲内で定量が可能であることを認めた.

Fig. 5 に各アミンについての溶液濃度と検出に要する最小スポット量の逆数との関係をしめす. これらの結果から検出限界を計算すると *p*-aminobenzoic acid 0.08 μ g; aniline 0.07 μ g; *p*-chloroaniline 0.16 μ g; *p*-phenetidine 0.13 μ g となる.

TABLE II. Fluorescence of *p*-Dimethylaminobenzal Amines on Filter Paper

Amine	Fluorescence	Amine	Fluorescence
$C_6H_5NH_2$	+	$C_6H_5NH_2$	+
$NH_2C_6H_4OC_2H_5$	++	$C_6H_5NHCH_3$	-
$NH_2C_6H_4Cl$	+	$C_6H_5N(CH_3)_2$	-
$NH_2C_6H_4COCH_3$	+		
$NH_2C_6H_4COCH_3$	+		
$NH_2C_6H_4CH_3(p)$	++	$ClC_6H_4NHCONH_2$	-
" (m)	+	$C_2H_5OC_6H_4NHCONH_2$	-
" (o)	+	$HOC_6H_4NHCONH_2$	-
$NH_2C_6H_4OCH_3(p)$	+		
" (m)	+		
" (o)	+	$C_2H_5OC_6H_4NHCOCH_3$	-
$NH_2C_6H_4COOH(p)$	++	$C_6H_5NHCOCH_3$	-
" (m)	+	$ClC_6H_4NHCOCH_3$	-
$NH_2C_6H_4NO_2(p)$	-		
" (m)	-

Fig. 4. Relationship between $\log m$ (m =detectable limit quantities, mole) of *p*-Dimethylaminobenzal Amines and Hammett's Substituent Constant σ of Substituted Groups of the Compounds

なお一級アミンは, aniline および電子供与性置換基を有するものの中から *p*-phenetidine, *p*-chloroaniline をえらび, 電子受容性基を有するものの中で *p*-aminobenzoic acid を対象に選んだ. 試薬の影響については, 1% D.A.B.A. 試薬は沱紙上で Sylvania 15w Black Blue ランプ下で肉眼で認めうる螢光を発しない. また, 過剰の試薬が噴霧されても螢光強度に差異は認められなかった.

TABLE III. Determination of *p*-Dimethylaminobenzal-*p*-chloroaniline by Dilution Method

Exp. No.	Concentration of <i>p</i> -chloroaniline	5	10	20	30
1		0.028	0.014	0.010	0.006
2		0.034	0.016	0.008	0.006
3		0.038	0.016	0.008	0.006
4		0.030	0.016	0.010	0.004
5		0.030	0.016	0.008	0.006
6		0.030	0.016	0.010	0.004
7		0.030	0.016	0.010	0.004
8		0.034	0.016	0.008	0.004
9		0.030	0.016	0.008	0.004
10		0.030	0.016	0.008	0.006
$\bar{x}$		0.038	0.015 ₈	0.008 ₆	0.005 ₂
σ		0.003	0.0009	0.0010	0.0010

b. 混合アミンの分離定量 アミンの混合物を沱紙上に展開分離し, 同時に各アミンを定量することを試み, *p*-phenetidine と *p*-chloroaniline を既知量混合した試料につき実験を行ない, 先に単品で求めた検量線を用いて, 各アミン量を計算し, 理論値と比較した. TABLE IV はその結果であり, 理論値とよく一致している.

TABLE IV. Separative Determination of *p*-Phenetidine and *p*-Chlorophenetidine by Paper Chromatography

Exp. No.	Concentration (γ /ml)			
	<i>p</i> -Phenetidine given	<i>p</i> -Phenetidine found	<i>p</i> -Chloroaniline given	<i>p</i> -Chloroaniline found
1	5.0	5.0	10.0	10.0
2	10.0	8.2	5.0	4.8
3	15.0	15.0	20	20
4	20.0	19.8	15.0	15.8
5	20.0	18.4	20.0	19.0

結 論

以上, 第一級アミンの多くは, 微量で *p*-dimethylaminobenzaldehyde との結合物が, 沱紙上で螢光を発し,

Fig. 5. Relationship between Concentration of Some Aromatic Amines and Detectable Limit Volumes of the Solutions

- *p*-chloroaniline ⊙ *p*-aminobenzoic acid
 ● *p*-phenetidine △ aniline

その鋭敏度が溶液におけるよりも、感度がよいためこの方法を利用すれば、微量の1級アミン類の検出および分離定量分析が可能である。なお、この方法では、ペーパークロマトグラフィーという手段から来る実験上の誤差はさけられないが、スポット量、溶液濃度、操作などの条件を適当にとればかなりよい精度で非常に微量なオーダーまで、定量出来ること、および混合アミンをペーパー上で分離し、かつ両者を同時に定量できる利点がある。なお、D.A.B.A.と第一級アミン化合物の発色、発蛍光の機作については次回に報告する。

謝辞 終りに、懇切な御助言を頂いた、近畿大学青山新次郎教授、名城大学大塚昭信教授に深く感謝する。