安息香酸およびアニリンの置換異性体のクロマトグラフィー

(昭和41年11月28日受理)

橋本 静信・山下 隆之^{*1}

1 緒 言

クロマトグラフィーによる分離定量は広い範囲の有機化合物に対して利用されており、近年、特に薄層クロマトグラフィーがその操作が簡単である利点を生かして発展してきた。またこれは液体クロマトグラフィー予備試験法としても多く用いられる。著者らは前報において担体であるシリカゲルに固定相として希アンモニア水を保持させた充填剤を用いる液体クロマトグラフィーによって、芳香族カルボン酸（オキシ安息香酸、アミノ安息香酸）の *o*, *m*, *p*-三異性体の相互分離を良好に行なうことができた。分離はシリカゲルに保持されたアンモニアと移動相中の有機酸の間の解離平衡と分配平衡が主な要因と考えられた。

今回は同様な考えのもとに比較的分離困難と考えられるアニリン類の *o*, *m*, *p*-三異性体の相互分離を容易に行なうことができると考え、シリカゲルを担体として弱酸を固定相とする充填剤を作りクロマトグラフィーを行なった。その結果クロルアニリン、ニトロアニリン、トルイジンの *o*, *m*, *p*-三異性体の相互分離に関して、シリカゲルに弱酸（リン酸、ギ酸、酢酸）を固定相として保持させた充填剤を作り、薄層クロマトグラフィーによって分離を行ない、適性ある充填剤が見い出されたので、これを用いて液体クロマトグラフィーを行なった。

2 実験方法

2.1 試料

安息香酸類およびアニリン類はいずれも市販品を蒸留または再結晶法などにより精製したものを使用した。*m*-ニトロ安息香酸¹⁾、*m*-アミノ安息香酸²⁾、*m*-オキシ安息香酸³⁾、*m*-クロルアニリン⁴⁾は常法によって合成したものを精製して使用した。

2.2 薄層クロマトグラフィー

薄層の作成には柴田化学器械工業の下降型クロマトプレート（長さ110 mm、幅20 mm、深さ1 mmの溝付ガラス板、上端および下端には溶媒誘導用の細穴を有す）を使用し、充填剤は保持体であるシリカゲル（100~200 mesh）^{*2} 3 g に対し、固定相として安息香酸類の分離の場合は1~4% アンモニア水を、アニリン類の場合は酢酸（5~15%）、リン酸（2~3%）、またはギ酸（5~

10%）の水溶液をそれぞれ1 ml 添加し、共栓付三角フラスコ中にてよくふりまぜて混合し、シリカゲルの表面が乾燥状態になるまでふりまぜたものを使用した。クロマトプレートへの充填はアプリケーターを使用し乾式にて行なった。試料はベンゼン溶液またはアセトン溶液（いずれも約5% 溶液）として、ガラス毛细管を用いて約2 mm³ にスポットした。展開は室温において大型シャーレ中水平法により展開させた。展開溶媒は別の小型シャーレ中に入れ、薄層プレートとの間を口紙にて連結した。展開後室内に放置して乾燥後、次に述べる検出法により検出した。ニトロ安息香酸は塩化第一スズ1 g を20% 塩酸5 ml に溶かした溶液を噴霧し、ゆるく加熱乾燥後、Pauly の試薬⁶⁾ を噴霧し、アンモニア蒸気中に入れて発色させた（黄~橙色に呈色）。オキシ安息香酸の場合は直接 Pauly の試薬を噴霧して発色させた（淡黄色に呈色）。サリチル酸は紫外線による紫色の蛍光によっても確認した。アミノ安息香酸およびアニリン類は5% 亜硝酸ナトリウム、2% 塩酸の等容量混合液を噴霧し、ジアゾ化後3% NW 酸を噴霧し、アンモニア蒸気中にさらしてカップリングさせて発色させた（淡橙色~赤色に呈色）。

2.3 液体クロマトグラフィー

クロマト管として内径10 mm、25 ml ビュレットを使用し、薄層クロマトグラフィーにおいて使用したのと同じ充填剤を湿式法により展開溶剤を用いて充填した。試料は約10~15 mg をできるだけ少量の展開溶剤（1~2 ml）にとかして加えた。流出液はフラクション・コレクターにて分取し、各フラクションについてそれぞれ溶質を定量した。安息香酸類の場合はナトリウムメチラートのベンゼン-メタノール溶液（0.05 N）、アニリン類の場合は過塩素酸のジオキサン溶液（0.1 N）を用いて滴定し、溶質濃度を求めた。ニトロアニリンは島津製回折格子型光電比色計スペクトロニック 20 によって *o*-体 400 mμ、*m*-体 370 mμ、*p*-体 370 mμ の波長を用いて比色しその濃度を求めた。

3 実験結果および考察

薄層クロマトグラフィー 安息香酸類、アニリン類の薄層クロマトグラフィーの結果を表1に示した。

液体クロマトグラフィー 薄層クロマトグラフィーにおいて比較的良好な分離を示したアミノ安息香酸、クロルアニリン、ニトロアニリンの *o*, *m*, *p*-三異性体の液体クロマトグラフィーによる分離に薄層クロマトグラフィーの条件を適用して試みた。結果を図1、図2に示す。また前述の条件を用いて次のものの分離を行なった。ニトロ安息香酸の *m*, *p*-体の分離は困難であり、トルイジンは液体クロマトグラフィーにおいて展開が困難であった。

^{*1} Shizunobu HASHIMOTO, Takayuki YAMASHITA 同志社大学工学部工業化学科：京都市上京区烏丸今出川。

^{*2} 洞海化学工業（株）シリカゲル Q₂₃。

1) 橋本静信，山下隆之，工化，69，1414（1966）。

2) O. Kamm, J. B. Segur, "Org. Synth.," Coll. Vol., I, p. 372.

3) 有機合成化学協会，“有機化合物合成法集”第14集，p. 4.

4) V. Hemick, J. Am. Chem. Soc., 64, 1737(1942).

5) D. A. Shirley, "Preparation of Organic Intermediates" (1951) p. 22.

6) 橋本庸平，“薄層クロマトグラフィー”，広川書店（1962）p. 52.

表1 安息香酸およびアニリン類の薄層クロマトグラフィー

No.	試料	充填剤 ^{a)}	展開溶媒	R _f 値	pK _a	液体クロマトグラフィーによる分離性
1	アミノ安息香酸	2% アンモニア水	ブタノール：ベンゼン 3：7	$\left\{ \begin{array}{l} o\text{-体} 0.41 \\ m\text{-体} 0.04 \\ p\text{-体} 0.19 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 4.98^c) \\ 4.79 \\ 4.92 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} o, p\text{-体は分離可能, } m\text{-体はカラム中に残存}^b) \end{array} \right\}$
2	"	5% 酢酸	ブタノール：ベンゼン 2：8	$\left\{ \begin{array}{l} 0.86 \\ 0.42 \\ 0.74 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 2.11^d) \\ 3.12 \\ 2.41 \end{array} \right\}$	
3	"	2% リン酸	"	$\left\{ \begin{array}{l} 0.57 \\ 0.03 \\ 0.28 \end{array} \right\}$	"	$\left\{ \begin{array}{l} o, m, p\text{-体相互分離可能, 図1} \end{array} \right\}$
4	"	5% ギ酸	ブタノール：ベンゼン 1：9	$\left\{ \begin{array}{l} 0.65 \\ 0.12 \\ 0.35 \end{array} \right\}$	"	
5	ニトロ安息香酸	2% アンモニア水	ブタノール：ベンゼン 4：6	$\left\{ \begin{array}{l} 0.07 \\ 0.24 \\ 0.25 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 2.17 \\ 3.45 \\ 3.44 \end{array} \right\}$	
6	オキシ安息香酸	"	ブタノール：ベンゼン 3：7	$\left\{ \begin{array}{l} 0.36 \\ 0.29 \\ 0.47 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 2.98 \\ 4.08 \\ 4.53 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} o\text{-体は分離可能, } m, p\text{-体はいく分重って流出}^b) \end{array} \right\}$
7	クロルアニリン	2% リン酸	アセトン：ベンゼン 3：7	$\left\{ \begin{array}{l} 0.66 \\ 0.29 \\ 0.15 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 2.62 \\ 3.31 \\ 3.81 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} o, m, p\text{-体分離可能, 図2} \end{array} \right\}$
8	ニトロアニリン	2% リン酸	ベンゼン	$\left\{ \begin{array}{l} 0.71 \\ 0.12 \\ 0.28 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} -0.28 \\ 2.25 \\ 0.98 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} o, m, p\text{-体分離可能} \end{array} \right\}$
9	トルイジン	5% 酢酸	ブタノール：ベンゼン 1：9	$\left\{ \begin{array}{l} 0.42 \\ 0.30 \\ 0.18 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 4.38 \\ 4.67 \\ 5.07 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} o, m, p\text{-体とも流出せず} \end{array} \right\}$

a) シリカゲル 3g に対し表記溶液を 1ml 添加したもの。

b) 前報において報告, c) 安息香酸類として, a) アニリン類として。

図1 アミノ安息香酸の液体クロマトグラフィー

試料：o-アミノ安息香酸 10.4 mg, m-アミノ安息香酸 9.7 mg, p-アミノ安息香酸 9.6 mg, カラム：SiO₂ 6g + 2% H₃PO₄ 2 ml (105 × 10 mm), 展開液：ベンゼン：ブタノール (9：1) 30 ml, (8：1) 30 ml, (7：1) 20 ml, (6.5：3.5) 40 ml にて順次展開

図2 クロルアニリンの液体クロマトグラフィー

試料：o-クロルアニリン 14.1 mg, m-クロルアニリン 13.5 mg, p-クロルアニリン 13.8 mg, カラム：SiO₂ 6g + 3% H₃PO₄ 2 ml (105 × 10 mm), 展開液：ベンゼン：アセトン (10：0) 20 ml, (9.5：0.5) 10 ml, (9：1) 10 ml, (7：3) 20 ml にて順次展開

以上の結果をまとめて見ると、アンモニアを保持したシリカゲルカラムでは安息香酸類の *o, m, p*-三異性体の薄層および液体クロマトグラフィーによる分離はアミノ安息香酸類は良好な結果を示したが、オキシ安息香酸では *m, p*-体の分離が不十分であり、

またニトロ安息香酸の *m, p*-異性体は分離しなかった。これは *m*-アミノ安息香酸のみが液体クロマトグラフィーで以上の溶剤では流出しないからである。

次に弱酸を保持したシリカゲルカラムではアニリン類の *o, m, p*-3異性体の分離はトルイジンを除き非常に良好な結果を得た。アミノ安息香酸の液体クロマトグラフィーでアンモニアを保持したシリカゲルカラムによる場合は *m*-体が流出しない欠点があったが、リン酸保持シリカゲルカラムでは *o, m, p*-体が完全に分離して流出した。トルイジン類は *o, m, p*-3異性体とも *R_f* 値が小であったが、さらに極性の強い溶媒を用いて展開することにより十分分離しうると考えられるが、しかし極性の強い溶媒（ベンゼン：ブタノール 5：5）を用いると固定相に用いた酸が移動するおそれがある。

薄層クロマトグラムの *R_f* 値および液体クロマトグラフィーの流出順位はアニリン類はその解離定数の小さい順位と一致した。安息香酸類では必ずしも一致しなかった。これは試料の展開剤に対する溶解度の違いなどによると考えられる。

アニリン類のクロマトグラフィーで用いたシリカゲルに保持した弱酸の効果について薄層クロマトグラフィーで比較したところ、一般にリン酸が最も分離能が良好であった。酸を保持したシリカゲルの性能を吸着等温線で比較するためにベンゼン溶液中のクロルアニリンの見掛けの吸着等温線 (25°C) を、リン酸、酢酸およびギ酸をそれぞれ保持したシリカゲルについて求めたところ、吸着等温線は Freundlich 式にはば一致した。Freundlich 式における *n* の値は 0.7~1.0 の間であり、3% リン酸を保持したシリカゲルの場合 *k* の値は *o*-体 4.37, *m*-体 8.71, *p*-体 12.6 と *o, m, p*-体に相当の開きがあり、10% 酢酸を保持したシリカゲル、3% ギ酸保持シリカゲルの *k* の値はすべて 2.57~5.13 の間にあり、*o, m, p*-体の *k* の値の差はリン酸の場合に比較し小であった。

4 総括

芳香族酸、アミン類とくに *o, m, p*-三異性体の相互分離を薄層クロマトグラフィー、および液体クロマトグラフィーにより検討した。充填剤として弱酸または弱塩基物質の希水溶液を保持したシリカゲルを用いて行なった。芳香族酸、アミン類の酸、塩基強度に応じて、*o, m, p*-3異性体の相互分離が可能であった。しかし芳香族カルボン酸の場合、*m, p*-体は分離困難な場合が多い。この方法はシリカゲル表面の固定相の酸または塩基と試料である芳香族酸、アミン類との間の解離平衡と分配平衡が大きな要因と考えられる。

最後にシリカゲルを御提供下さった洞海化学工業(株)に感謝いたします。