薄層クロマトグラフィーによる色素の 分析について (第9報)

フロキシン中の副生成物, とくに緑色ケイ光性物質について

(昭和44年1月27日受理)

神 蔵 美 枝 子*

Thin Layer Chromatography of Synthetic Dyes (IX) Subsidiary Substance in Commercial Phloxine with Reference to Greenish Fluorescent Substance

Mieko KAMIKURA

(National Institute of Hygienic Sciences: Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

A colorless spot which emitted greenish fluorescence by irradiation of ultraviolet light (2537Å or 3660Å) has occasionally been observed on paper and thin layer chromatograms obtained from commercial phloxine. The greenish fluorescent substance was separated from a commercial sample of phloxine by means of preparative thin layer chromatography using silica gel without binder and a mixture of methyl ethyl ketone + *n*-propyl alcohol + water (20:2:3) as a developing solvent. The separated zone of the substance was extracted from silica gel with water. Ultraviolet ($\lambda_{\max}$ 251 m μ , 368 m μ), fluorescence emission (E_m , $\lambda_{\max}$ 490~496 m μ excitation wavelength: 380 m μ), fluorescence excitation (E_x , $\lambda_{\max}$ 378~382 m μ , emission wavelength: 490 m μ) and infrared spectra of the isolated substance were measured. These spectra were identical with those of 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid. The infrared spectra are shown in Fig. 2-D, and the fluorescence emission and excitation spectra in Fig. 5. A mixed sample of the substance and 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid gave a single spot on chromatoplates of silica gel when it was developed by use of different solvent systems. From the above results, the greenish fluorescent substance isolated from commercial phloxine was found to be 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid.

(Received January 27, 1969)

まえがき

フロキシンはテトラクロルフタル酸とレゾルシンの縮合によって生成したテトラクロルフルオレセインの臭素化によってつくられる。フロキシンの市販品を薄層クロマトグラフィー (以下, TLC と略す) またはロ紙クロマトグラフィー (以下, PC と略す) にかけて、そのクロマトグラム上に低臭素化体と思われる副色素のほか、紫外線によって緑色のケイ光を発する物質が検出される場合がある。原料であるテトラクロルフルオレセインも緑色のケイ光を発するが、この緑色ケイ光性物質は

TLC ならびに PC の結果からテトラクロルフルオレセインとは異なる物質であることを認めたので、その緑色ケイ光性物質をフロキシンから単離し、紫外吸収スペクトル (以下, UV スペクトルと略す)、赤外吸収スペクトル (以下, IR スペクトルと略す)、励起ならびにケイ光スペクトルを測定し、その本体を明らかにすることができたので報告する。

試料, 試薬および装置

(1) 試料

フロキシンは国立衛生試験所標準品ならびに市販品を用いた。また、2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid は前報¹⁾で得たものを

* 国立衛生試験所食品添加物部: 東京都世田谷区上用賀1-18-1

使用した。

(2) 試薬および装置

第6報²⁾に準じた。なお、ロ紙クロマトグラフィーにおいてロ紙は東洋ロ紙 No. 50 (6×40 cm) を用い、展開剤として25%エタノール + 5%アンモニア溶液(1:1)の混液³⁾を用いた。

紫外線発生装置: Black-Ray Model BLF 6(3660Å); Mineralight Model V 41 (2537Å) (Ultra Violet Products Inc.).

日立分光ケイ光光度計 MPF-2A 型。なお、測定にはケイ光用石英セル (1×1×4.5 cm, ふた付) を用いた。

実験方法

(1) プレートの作製

第6報²⁾に準じた。

(2) 検出法

第8報¹⁾に準じた。

(3) ロ紙クロマトグラフィー

第2版食品添加物公定書の方法に従った。

実験結果および考察

(1) フロキシンの薄層クロマトグラフィーおよびロ紙クロマトグラフィー

フロキシンはその 0.1% 水溶液あるいはさらに高濃度の水溶液を25%エタノール + 5%アンモニア溶液(1:1)の混液で PC を行なうと、フロキシンの下方、Rf 約 0.32 の位置に 2537Å あるいは 3660Å の紫外線によって緑色のケイ光を発する物質を認めることがある。この

緑色ケイ光性物質は微量の場合には無色のスポットとして示されるが、多量に存在すると淡黄色スポットとして検出される。この物質はメチルエチルケトン + 水 (20:1.0) の混液⁴⁾を用いて TLC を行なった場合にも同様に色素から著しく離れた位置にその存在が認められる (Fig. 1)。

原料であるテトラクロロフルオレセインあるいはフルオレセインも紫外線下で類似のケイ光を発するが、これらは Table 1 に示したようにフロキシン中に含まれる緑色ケイ光性物質とその Rf がかなり相違し、明らかに異なる物質であることがわかる。

(2) 緑色ケイ光性物質の単離

緑色ケイ光性物質の本体を究明するために、まずフロキシンの濃厚水溶液 (5%) についてメチルエチルケトン + 水 (20:1.0) の混液で展開したところ、Fig. 1 に示した 0.1% 水溶液を用いたときのように良好な分離が得られなかった。そこでジオキサン + ベンゼン + 氷酢酸 (25:90:4) の混液で展開したところフロキシンとの分離が良好であったので、この展開剤を用い、シリカゲル D 5 のプレート (200×200 mm, 厚さ 500 μ) の一端から 2.5 cm の距離に色素溶液 (約 0.05 ml, 約 2.1 mg) を線状につけ 15 cm 展開したのち、とり出し、風乾した。つぎに、このプレートに 2537Å の紫外線を照射し、緑色ケイ光を発する部分を集めた。この実験に使用したプレートは70枚であった。抽出操作は便宜上4グループに分けて行なったが、その方法はプレート20枚について緑

Fig. 1. Thin layer and paper chromatograms of commercial phloxine

1: Phloxine standard 2: Commercial phloxine
 Developing solvent: TLC: Chloroform + Glacial acetic acid (4:1)
 PC : 25% Ethyl alcohol + 5% Ammonium.
 hydroxide solution (1:1)
 Adsorbent: Silica gel D 5 (Camag), Paper: Toyo Roshi No. 50
 Detection : Short wavelength (2537Å) ultraviolet light

色ケイ光のはん点の部分を集め（シリカゲルの重量約16 g）、これを4本の遠心沈殿管に均等に移し、各管にエタノール20 mlを加え、ときどきかき混ぜながら約1時間放置したのち遠心分離した（3000 r.p.m., 15分）。上澄液を分離し、エタノール抽出液が2537Åの紫外線によってほとんど緑色のケイ光を示さなくなるまでこの操作を繰り返した（約7回）。エタノール抽出液はロータリーエバポレーターで蒸発乾固したのち、残留物を少量のエタノールに溶かし、これを試料とし、クロロホルム+氷酢酸（4:1）の混液⁴⁾でふたたび展開し緑色ケイ光性物質を精製した。前と同様にエタノールで抽出し、エタノールを蒸発すると黄色の残留物が得られた。これに水少量を加えると黄色の不溶物を多量に析出したのでろ過し、淡黄色のろ液を凍結乾燥すると、かさ高の黄色物質を得た。この黄色物質のIRスペクトルはFig. 2-Aに示すように1630 cm⁻¹, 1560~1540 cm⁻¹, 1405 cm⁻¹に強い吸収が認められた。そこで、これらの吸収が何に起因するかをしらべる目的で、硫酸カルシウムを含むシリカゲルをジオキサン+ベンゼン+氷酢酸（25:90:4）の混液で展開したのち、風乾し、ガラス板上のシリカゲルをはがし、このシリカゲルについて上記と同様にエタノール抽出を行ない、得た白色の抽出物についてIRスペクトルを測定した（Fig. 3）。その結果はFig. 4に示す酢酸カルシウムの吸収とやや類似するスペクトルが得られた。酢酸カルシウムの865 cm⁻¹にみられる吸収があらわれていないことから断定はできないが、少なくとも酢酸塩が含まれているものと思われる。同様にFig. 2-Aの上記の吸収はFig. 4の酢酸ナトリウムの標準IRスペクトルとの比較から抽出物中に含まれる酢酸塩によってあらわれたものと考えられた。すなわち、Fig. 3の場合と相違し、フロキシンが展開剤中の酢酸によって色素酸になり、そのために塩を形成していたナトリウムが薄層を浸透移動する酢酸によって酢酸ナトリウムとなり、これがエタノール抽出操作によって抽出液中に移行したと思われる。

酢酸を含まないメチルエチルケトン+水（20:1.0）を精製用の展開剤として用い、さきの抽出試料について再度精製を行なったが、Fig. 2-Bに示すように不純物を除去することができなかった。

以上のことから吸着剤中に含まれる硫酸カルシウムならびに展開剤中の酢酸が緑色ケイ光性物質のIRスペクトルの測定、すなわち単離のために大きな障害となっていることがわかったので、硫酸カルシウムを含まないシリカゲル（Camag, DO）を用い、緑色ケイ光性物質とフロキシンの良好な分離用展開剤としてメチルエチルケトン+n-プロパノール+水（20:2:3）の混液を選び、上記のごとく操作した。この場合、試料中のケイ光性物質は塩を形成しているため、エタノ

Fig. 2. Infrared absorption spectra of greenish fluorescent substance isolated from commercial phloxine (KBr)

- A: Sample isolated by preparative thin layer chromatography using silica gel containing binder and a solvent system of chloroform + glacial acetic acid (4:1) mixture as developing solvent
 - B: Sample A purified by preparative thin layer chromatography using silica gel containing binder and a solvent system of methyl ethyl ketone + water (20:1.0) mixture as developing solvent
 - C: Sample isolated by preparative thin layer chromatography using silica gel without binder and a solvent system of methyl ethyl ketone + n-propyl alcohol + water (20:2:3) mixture as developing solvent
 - D: Sample C purified by extraction with ether from a solution acidified with hydrochloric acid
- Refined greenish fluorescent substance
 2,3,5-Trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid

Fig. 3. Infrared absorption spectrum of the extract of binder-containing silica gel obtained by treatment with ethyl alcohol after chromatographed using dioxane + benzene + glacial acetic acid (25:90:4) mixture as developing solvent (KBr)

Sodium acetate (Standard spectrum, IRDC No. 6217)

Fig. 4. Infrared absorption spectra of sodium acetate and calcium acetate (KBr)

ールよりも水で抽出された。水抽出液を集め濃縮した。残留物は冷時に水を加えて振り混ぜ、わずかに混在する色素分（フロキシン中に含まれる付随色素に種々あり、そのなかで緑色ケイ光性物質と類似の移動率を示す色素の微量が混入してきた）を溶解度の差によって目的物から除き黄色物質を単離した。目的物である黄色物質は約20 mlの水を加えて約60°に加温すると、ほとんど黄色澄明に溶解した。この液をろ過し、ろ液はカサ高の物質を得る目的で凍結乾燥したのちIRスペクトルを測定すると、凍結試料はFig. 2-Cに示すように1200~1050 cm⁻¹にブロードなスペクトルを与え、微量のシリカゲルが混在していること、また中性展開剤を使用したため塩となっているため特異なスペクトルを与えないことがわかったので、さらに精製するために、この試料を水に溶かし塩酸酸性としてエーテルと振り混ぜた。この操作

を2回繰り返すときには、水層をアルカリ性とし2357 Å紫外線を照射するときケイ光を示さず、また、この水層の蒸発残留物について行なったジオキサン+ベンゼン+氷酢酸(25:90:4)による薄層クロマトグラムからもケイ光性物質の存在を認めなかったもので、緑色ケイ光性物質は完全にエーテル層に移行したと思われる。エーテル抽出液はロータリーエバポレーターで濃縮し、残留物に50%エタノールを加え約60°に加温して溶かしたのち、冷蔵庫内に放置(約24時間)すると類白色物質を析出した。

(3) 緑色ケイ光性物質の吸収スペクトル

(2)で得た類白色物質の0.1 N水酸化ナトリウム溶液は波長251 mμと368 mμに極大吸収を有し、2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acidのそれと一致した。

(4) 緑色ケイ光性物質の励起ならびにケイ光スペクトル

(2)で得た類白色物質は2537 Åあるいは3660 Åの紫外線によって緑色のケイ光を発するので、標品として用いた2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acidとともに励起ならびにケイ光スペクトルを測定した。標品は波長380 mμの光線で励起すると輻射極大は波長490~496 mμ(未補正)に、また、この極大波長に設定したときの励起極大は波長378~382 mμ(未補正)にあった。緑色ケイ光性物質についても輻射極大ならびに励起極大波長は標品のそれと一致した(Fig. 5)。

(5) 緑色ケイ光性物質のIRスペクトル

(2)で得た類白色物質についてIRスペクトルを測定したところ、1700 cm⁻¹から780 cm⁻¹にみられる吸収が2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acidのそれと一致した。(Fig. 2-D)しかし1700 cm⁻¹と1435 cm⁻¹にみられる吸収は他の吸収との比較において、その強度比に標品のそれとわずかな相違がみられたが、これはおそらく2860 cm⁻¹にあらわれた吸収に原因があると考えられる。2860 cm⁻¹における吸収は塩型においてもわずかに認められたが、酸型に変えたスペクトルにおいて、かなり強く認められた。この波数における吸収はAlkyl基に原因があると考えられるが、本物質の精製に使用した溶媒であるエタノール、エーテルの吸収のそれとは異なり、また、1100 cm⁻¹付近に強い吸収が認められないことから、これらの溶媒の混入による吸収でないことは明らかである。また、もしカルボン酸がエステルを形成しているのならば、そのAlkyl基によって吸収があらわれるが、エステルの場合には一般に1730 cm⁻¹に吸収があらわれるから、それとも一致しない。したがって抽出操作中に混入した溶媒中のAlkyl性不純物によるものと考えられる。

Fig. 5. Fluorescence excitation and emission spectra of 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid and greenish fluorescent substance isolated from commercial phloxine

Solid line : 2,3,4-Trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid, concentration 2 $\mu\text{g/ml}$

Dashed line: Greenish fluorescent substance isolated from commercial phloxine

Excitation wavelength: 380 $\text{m}\mu$

Emission wavelength : 490 $\text{m}\mu$

Solvent: 0.1 N sodium hydroxide solution

さらに、各種の展開剤を用い TLC を行なったところその結果はいずれも 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid のそれと一致し、この標品を混和した試料溶液についてのクロマトグラムも 1 つのはん点のみを与えた。上記物質と構造のきわめて類似する緑色ケイ光性物質で臭素を含まない 2,3,4-

trichloro-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid の Rf も併記したが、単離した物質はこれとは一致しなかった (Table 1)。

以上の結果から市販のフロキシン中に含まれる緑色ケイ光性物質は 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid であることがわかった。本物質がフロキシン中に混在する原因については明らかでないが、前報¹⁾の知見から製造過程においてフロキシンが一部分解して 2-(3',5'-dibromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-tetrachlorobenzoic acid を生成し、このものがさらに上記のキサントン型構造の物質へと変化したものと推定される。

結 論

市販のフロキシンはその水溶液について TLC あるいは PC を行なうと、フロキシンならびにその低臭素化体である赤色の色素のほか、2537 Å あるいは 3660 Å の紫外線によって緑色のケイ光を発する物質の存在を認めることがある。そこで、この緑色ケイ光性物質をフロキシンから TLC によって単離し、得られた類白色結晶について UV、ケイ光、励起ならびに IR スペクトルを測定したところ、それらの結果はいずれも 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid のそれと一致した。したがってフロキシン中に混在する緑色ケイ光性副生成物は 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid であることをみいだした。

終わりに臨み、本研究について種々御指導を賜わり、ご校閲いただいた東京薬科大学教授藤井清次博士、ご鞭撻いただいた国立衛生試験所薬品部長井上哲男博士なら

Table 1. Rf Values for Greenish Fluorescent Compound Isolated from Commercial Phloxine and the Related Compound

No.	Compound	PC	TLC					UV light (3660 Å)
		A	B	C	D	E		
1	Phloxine	0.67	0.45	0.75	0.16	0.44	Orange-Red	
2	Greenish fluorescent compound	0.32	0.26	0.47	0.07	0.32	Green	
3	2,3,4-Trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid	0.33	0.25*	0.47*	0.06	0.31	Green	
4	Fluorescein	0.78	0.23	0.19	0.69	0.74	Greenish Yellow	
5	Tetrachlorofluorescein	0.87	0.32	0.39	0.69	0.74	Orange-Yellow	
6	2,3,4-Trichloro-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid	0.66	0.11*	0.20*	0.05	0.30	Green	

Developing solvent: A: 25% Ethyl alcohol + 5% Ammonium hydroxide solution (1:1) B: Di-oxane + Benzene + Glacial acetic acid (25:90:4) C: Chloroform + Glacial acetic acid (4:1) D: Methyl ethyl ketone + H₂O (20:1.0) E: Methyl ethyl ketone + *n*-Propyl alcohol + H₂O (20:2:3)

Adsorbent: Silica gel D5 (Camag) Used air-dried chromatoplates

PC: Paper chromatography TLC: Thin layer chromatography

* Reference: Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 9, 356 (1966).

びに同所食品添加物部長谷村顕雄博士に対し、お礼申し上げます。また、IR スペクトルの測定にご配慮いただいた同所療品部小嶋茂雄技官にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 神蔵美枝子：食衛誌. **9**, 348 (1968).
- 2) 神蔵美枝子：同上. **8**, 427 (1967).
- 3) 第2版食品添加物公定書 p. 198 (1966).
- 4) 神蔵美枝子：食衛誌. **7**, 338 (1966).