薄層クロマトグラフィーによる色素の 分析について (第 10 報)

フロキシシン (食用赤色 104 号) 中の緑色けい光性副生成物,
2,3,4-Trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-
carboxylic acid の定量

(昭和 45 年 4 月 1 日受理)

神 蔵 美 枝 子*

Thin Layer Chromatography of Synthetic Dyes (X)
Quantitative Analysis of a Greenish Fluorescent Substance,
2, 3, 4-Trichloro-5, 7-Dibromo-6-Hydroxyxanthone-1-
Carboxylic Acid in Commercial Phloxine
(Food Red No. 104)

Mieko KAMIKURA

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

The quantitative thin layer chromatographic method of a greenish fluorescent substance, 2, 3, 4-trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid found in commercial phloxine (Food Red No. 104) was studied.

The maximum wave length of this substance was at 251 m μ and 368 m μ in 0.1 N sodium hydroxide solution. The calibration curves were linear in the range of 1~10 μ g/ml at 251 m μ and 1~20 μ g/ml at 368 m μ (Fig. 1). The maximum of the spectrum shifted from 368 m μ to 383 m μ by addition of ethyl alcohol. Also the determination of this substance was readily performed with a fluorometric method. The calibration curves were linear in the range of 1×10^{-7} M ~ 4×10^{-6} M at 494 m μ (emission maximum) (Fig. 3). The fluorescence intensity was increased by addition of ethyl alcohol, and the maximum of intensity was obtained the ratio 1 : 1 between 0.2 N sodium hydroxide solution and ethyl alcohol (Fig. 2).

The quantitative thin layer chromatographic method was applied for the determination of 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid in commercial phloxine. The amount of this substance was measured with an ultraviolet spectrophotometric and fluorometric methods after it is separated on chromatoplates using a solvent system of methyl ethyl ketone, *n*-propyl alcohol and distilled water (20 : 2 : 3) and eluted with distilled water. The recovery in these methods was satisfactory to both an ultraviolet spectrophotometric and fluorometric methods, and the results obtained are shown in Table 3. In case of the ultraviolet spectrophotometric method the absorbance at 251 m μ and 368 m μ of the material eluted from the silica gel layer has influence on the determination of this substance. Therefore, the absorbance at these wave lengths was investigated using various silica gel adsorbent (Tables 1 and 2). On the silica gel layer the minimum detectable amount was found to be 0.01 μ g of 2, 3, 4-trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid (Table 4). Commercial phloxine was found to contain 1~3.02 per cent of this substance (Table 5).

(Received April 1, 1970)

* 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

まえがき

前報¹⁾において、フロキシン (食用赤色 104 号) の薄層クロマトグラフィー (以下、TLC と略す) あるいはロ紙クロマトグラフィーによって得られたクロマトグラムのなかには紫外線によって緑色のけい光を発する物質の存在することがあり、この緑色けい光性物質をフロキシンから単離し、本物質は 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid (以下 tri-Cl-di-Br-Xanthone と略す) であることをみいだした。さらに、第 8 報²⁾における 2-(3',5'-dibromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-tetrachlorobenzoic acid の変化成績体についての知見から、本物質はフロキシン製造時において色素の一部分解により生成した副生成物であることが判明した。

そこで、さらに tri-Cl-di-Br-Xanthone の定量方法について検討し、市販のフロキシン中に含まれる本物質について定量を行なったので、それらの結果について報告する。

試料、試薬および装置

(1) 試料

tri-Cl-di-Br-Xanthone は第 8 報²⁾で得たものを用いた。

フロキシンは市販品を用い、そのなかで TLC を行なったあとのクロマトグラムに紫外線を照射するとき緑色のけい光を発するものをとくに選んだ。

(2) 試薬および装置

第 9 報¹⁾に準じた。

硫酸キニーネ: 80% エタノールから再結晶し、ついで水から再結晶し、風乾した。本物質はけい光基準物質として用いた。

実験方法

(1) プレートの作製

第 6 報³⁾に準じた。

(2) 検出法

第 9 報¹⁾に準じた。

(3) 測定方法

吸光度測定法は常法により行ない、けい光強度の測定にはけい光用石英セルを用いて、みかけの励起極大中心波長ならびに輻射極大中心波長におけるけい光相対強度 (メーターの指示、%) から、同様に操作して得た空試験値を差し引いた値を試料溶液の測定値とする。べつに tri-Cl-di-Br-Xanthone の標準液につき同様に操作して得た値を比較標準液の測定値とし、この値からフロキシン中の tri-Cl-di-Br-Xanthone の量を算出した。

実験結果および考察

薄層クロマトグラフィーを用いて定量分析を行なう場合、クロマトグラムから目的物を溶出する方法、または、直接法としてスポットの面積による方法あるいは濃度計による積算によって行なう方法がある。溶出法はさ

らに比色、分光、けい光分析などに分けられる。

本物質は紫外部に極大吸収があることならびにけい光を有することなどから、定量に際して簡易に応用できる方法としては分光測光法ならびにけい光法があげられる。

さきに、Kirchner ら⁴⁾ はみかん類の種々の製品中に含まれる biphenyl について TLC を用いての定量方法を検討しているが、それによると、試料の展開に先だってプレートをあらかじめ 95% エタノールで洗うと、プレート中に含まれる不純物が除去されて盲検値を小さくすることができると述べており、 $\pm 2.8\%$ の平均誤差があるといわれる。また、Stanley ら⁵⁾ の行なった同上物質の定量に關しての報告によれば、定量に使用した測定波長 248 m μ におけるけい酸薄層の盲検値は通常 0.015~0.020 であるという。一般に TLC による定量分析においては誤差が約 5% あるといわれ、理想の場合においてさえ 3% の誤差はありうるといわれる。また、けい光定量においてもある程度の定量誤差はさけられない⁶⁾。

そこで、紫外部吸収法ならびにけい光法による tri-Cl-di-Br-Xanthone の定量について検討を行なった。

(1) 紫外部吸収法

第 8 報²⁾において tri-Cl-di-Br-Xanthone は水よりもアルカリ性の水によく溶け、極大吸収波長は 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液において 251 m μ と 368 m μ にあることを報告した。

本物質の 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液は波長 251 m μ において 1~10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示し、波長

Fig. 1. Calibration curves of 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid
— 0.1 N Sodium hydroxide solution
--- 0.2 N Sodium hydroxide solution + Ethyl alcohol (1:1)

368 m μ においては 1~20 μ g/ml の範囲で直線性が示された。さらに、0.2 N 水酸化ナトリウム溶液+エタノール (1:1) の混液について検討したが、波長 368 m μ における吸収の極大は 383 m μ と長波長側にシフトし、1~10 μ g/ml の範囲で直線性がみられるが、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液と比較して吸収の強度はやや劣る。波長 251 m μ においても 1~10 μ g/ml の範囲で直線性がみられるが期待したほどの溶媒効果は得られなかった (Fig. 1)。さらに経時変化についてみると、24時間後あるいは48時間後においては 251 m μ と 368 m μ の吸収に有意な差が認められた。

(2) けい光法

前報¹⁾における結果から、tri-Cl-di-Br-Xanthone は 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液において励起極大は 380 m μ 、輻射極大は 494 m μ にあることが認められた。し

たがって本物質はけい光を応用しての定量が可能であると考え。本物質のけい光はアルカリ溶液にエタノールを加えると増大することが観察され、けい光に対するエタノールの溶媒効果を検討したところ、アルカリ濃度 0.1 N においてエタノールが 50% 加えられた段階でほぼ最大となり、以後エタノールを追加しても影響が認められなかった (Fig. 2)。

さらに、本物質のけい光定量の可能性についてしらべたところ、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液ならびに 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液+エタノール (1:1) の混液において 1×10^{-7} ~ 4×10^{-6} M の範囲で直線性を示し、いずれも 5×10^{-6} M 以上で濃度消光を示しはじめることがわかった (Fig. 3)。なお、両溶媒のけい光はゼロであった。

けい光定量の場合の再現性は 1 μ g/ml 溶液においてけい光の強さ (メーターの指示) の平均値 83%, 標準偏差 0.30 であった。けい光の安定性は精製した硫酸キニーネをけい光基準物質として選び、本物質の 1 ppm 溶液について検討したところ、つぎのような結果を得た。すなわち、48時間後におけるけい光の強さは、最初の測定値を 100 とした場合に、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液においては 100.86%, 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液+エタノール (1:1) の混液においては 98.92% で、いずれも機器における測定誤差範囲内におさまるものと考えられる。したがって本物質は 48 時間以内では消光が認められず安定であると考え。

(3) 薄層クロマトグラムから 2,3,4-tri-chloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid の定量

1) 紫外外部吸収法

Fig. 2. Effect of ethyl alcohol on fluorescence intensity (0.1 N Sodium hydroxide solution)
Excitation: 390 m μ
Emission: 494 m μ

Fig. 3. Calibration curves and effect of ethyl alcohol on fluorescence intensity

	0.1 N NaOH	0.2 N NaOH + EtOH (1:1)
Excitation wavelength:	380 m μ	390 m μ
Emission wavelength:	494 m μ	494 m μ

さきにも述べたように、まず使用する吸着剤中に含まれる紫外外部吸収物質が問題となる。そこで各社のシリカゲルについて 251 m μ と 368 m μ における吸収について検討した。すなわち、共セン遠沈管にシリカゲル 0.5 g をとり、水あるいはエタノール 10 ml をそれぞれ加え、ときどきかき混ぜながら 1 時間放置した。ついで遠心分離 (3500 r. p. m., 20 min.) し、上澄液について波長 251 m μ と 368 m μ における吸収を測定した。その結果、おおむね 251 m μ における吸収の方が 368 m μ における吸収よりも大なることが認められた。251 m μ における吸収は、水抽出液を水酸化ナトリウムアルカリ性としたのちエーテルと振り混ぜるとき、その一部をエーテル層へ移行させ、減少させることができた。これらの波長における吸収の最も小さなシリカゲルは MN シリカゲル G-HR であることが判明した (Table 1)。

以上の結果はシリカゲル中に含まれる紫外外部吸収性妨害物についてのデータであるが、これらの吸着剤を使用してプレートを作製し、このプレートがさらに目的物の分離に使用され、適宜の展開用溶媒によって展開される

Table 1. Ultraviolet-absorbing Background Impurities Containing in Silica Gel Adsorbent

Commercial products	Absorbance			
	251 m μ H ₂ O EtOH*		368 m μ H ₂ O EtOH*	
Camag Silica gel				
D 0	0.059	0.097	0.020	0.025
D 5	0.060	0.084	0.018	0.018
DS 0	0.153	0.112	0.055	0.033
DS 5	0.039	0.110	0.015	0.024
Merck Silica gel				
G	0.057	0.058	0.024	0.012
H	0.114	0.123	0.034	0.013
MN Silica gel				
G	0.041	0.069	0.014	0.018
S	0.074	0.079	0.021	0.013
GHR	0.023	0.043	0.010	0.003
SHR	0.031	0.075	0.006	0.008
Wako Silica gel				
B 0	0.101	0.082	0.041	0.023
B 5	0.097	0.092	0.031	0.017

Ten milliliters of distilled water or ethyl alcohol were added to 0.5 g of silica gel, and after being stirred gently for 1 hour, the silica gel was centrifuged down, and the absorbance of the supernatant was measured at lengths of 251 m μ and 368 m μ , respectively

* Abbreviation: EtOH = Ethyl alcohol

とき、定量の目的のためにガラス板からはがしとられた吸着剤中に紫外外部吸収を示す物質がどのように移行してくるかを、さらに検討する必要があった。

まず、通常用いられるシリカゲル D 0, D 5 ならびに Table 1 の結果からみて MNG-HR を選び、それらのプレート (5 $\times$ 20 cm) を用い、メタノール、エタノール、メチルエチルケトン+*n*-プロパノール+水 (20:2:3) の混液で展開を行ない、tri-Cl-di-Br-Xanthone の位置に相当するシリカゲルをはがしとり (ca. 0.05 g に相当する)、このシリカゲルを用いて上記の場合と同様に操作し、抽出された紫外外部吸収物質の吸収をしらべた。さらに、メタノールならびにエタノール展開を行なって洗浄したプレートを用い、メチルエチルケトン+*n*-プロパノール+水 (20:2:3) の混液を展開用溶媒として展開し、上記と同様に tri-Cl-di-Br-Xanthone の位置に相当するシリカゲルについての紫外外部吸収を測定したところ、メタノールあるいはエタノール洗浄プレートを使用するとき紫外外部吸収物質の一部分が除去され、したがって、その吸収を減少せしめる効果があることが判明した。この場合 MN シリカゲル G-HR プレートを使用时、その吸収はいずれの波長においても最小であった。しかし、いずれの場合においても 251 m μ における吸収は 368 m μ のそれよりも大であり、測定波長として 251 m μ を用いることは好ましくないと考える (Table 2)。

すなわち、シリカゲル D 5 についてみると、プレートをメタノールあるいはエタノールで洗浄すればある程度の紫外外部吸収物質が除去できるし、また、ただ単に物質の分離に使用される展開用溶媒のしん透移動する段階においてもその一部を除去しうることがわかった。

tri-Cl-di-Br-Xanthone の薄層からの回収についての検討は、シリカゲルの紫外外部吸収性についての実験結果からみて、シリカゲル D 0 ならびに MN シリカゲル G-HR を用いた。すなわち、これらの吸着剤のプレート (5 $\times$ 20 cm) に本物質の 100 ppm 溶液 0.1 ml ならびに 0.1 ml $\times$ 2 をそれぞれ塗布し、このプレートをアンモニア蒸気中に 10 分間放置したのち、とり出し、メチルエチルケトン+*n*-プロパノール+水 (20:2:3) の混液で展開した。展開後の薄層は紫外線を照射し、緑色のけい光を発する部分のシリカゲルをはがしとり、水 2 ml, 1 ml $\times$ 2 ずつを用いてそれぞれ 10 分間かく拌しつつ浸出を行ない、遠心分離したのち、N-水酸化ナトリウム溶液 1 ml, エタノール 5 ml を加え、全量を 10 ml とし、極大吸収波長における吸光度を測定し、回収率を求めた (Table 3)。

紫外外部吸収法を用いての定量は、シリカゲル D 0 の場合には波長 368 m μ において測定した方が好結果を得ることがわかったが、MNG-HR においては抽出液に N-水酸化ナトリウム溶液を加えることによって白濁し、ゲル状の析出物が認められた。そのため回収率は低い値と

Table 2. The Ultraviolet-absorbing Background Impurities Containing in the Silica Gel Layer

Plate		Developer	Absorbance*2	
			251 m μ (H ₂ O)	368 m μ (H ₂ O)
Untreated	MN Silica gel GHR	A*1	0.036	0.007
	Camag Silica gel D 0	A*1	0.089	0.010
	D 5	A*1	0.095	0.033
	D 0	Methyl alcohol	0.063	0.017
	D 5	do	0.066	0.018
	D 0	Ethyl alcohol	0.057	0.010
	D 5	do	0.073	0.018
Treated	Ethyl alcohol-washed D 0	A*1	0.049	0.010
	D 5	A*1	0.050	0.015
	Methyl alcohol-washed D 0	A*1	0.051	0.010
	D 5	A*1	0.053	0.016

*1 Developer A: Methyl ethyl ketone + *n*-propyl alcohol + H₂O (20 : 2 : 3)

*2 The absorbances for the aqueous elute obtained from the corresponding silica gel layer to the location of the spot of 2, 3, 4-trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid

Table 3. Recovery of 2, 3, 4-Trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic Acid from the Silica Gel Layer with the Ultraviolet Spectrophotometric and the Fluorometric Methods

Quantity (μ g)	Plate	Recovery (%)	
		UV Spectrophotometric 251 m μ 368 m μ	Fluorometric <i>E_m</i> λ_{max} : 494 m μ *
10	MN Silica gel GHR	83.75 86.96	
10	Camag Silica gel D 0	81.86 102.05	
20	do	81.56 103.48	
10	do		94.33
8	do		92.19
5	do		90.50
2	do		90.18

The plates were developed with a solvent of methyl ethyl ketone + *n*-propyl alcohol + H₂O (20 : 2 : 3)

* Emission maximum

なった。このことは恐らくゲル状沈殿物中に本物質が含まれたためと考えられる。したがって、本吸着剤は、それ自体に含まれる紫外部吸収物質は少ないが水溶液中でアルカリによって沈殿を生起されるような物質が混入するため、本実験における定量の目的のためには使用できないことがわかった。

2) けい光法

1) の紫外部吸収法と同様に操作して、薄層上から tri-Cl-di-Br-Xanthone を抽出し、けい光測定を行な

った。なお、シリカゲル D 0 薄層を用いて試料の場合と同様に操作した抽出液について測定したところケイ光を示さなかった。回収率は Table 3 に示すように 2~10 μ g を適用させた場合において満足すべきものであった。なお、本物質は 1 回目の抽出液中に約 80% 移行することが認められた。

3) 薄層上における検出限界

tri-Cl-di-Br-Xanthone の薄層上における検出限界は、絶対量として 0.01 μ g であった (Table 4)。この数

Table 4. The Minimum Detectable Amount of 2, 3, 4-Trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic Acid on the Silica Gel Layer

Concentration of solution (ppm)	Spotted*		UV light	
	ml	μ g	2537 Å	3660 Å
50	0.002	0.1	≡	≡
10	0.002	0.02	≡	≡
5	0.002	0.01	+	+
2.5	0.002	0.005	±	±

* Camag silica gel D 0 plates were used

値に基づいてフロキシン中に含まれる本物質の検出限界を求めたところ、フロキシン中に 0.5% 含まれる場合においては 0.1% 色素溶液 0.002 ml を用いて TLC を行なうとき、薄層上での検出が可能であることが認められた。

(4) 市販フロキシン中に含まれる 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid の定量

フロキシンの 1% 水溶液 0.1 ml を用いてシリカゲル D 0 の薄層によりメチルエチルケトン+*n*-プロパノール+水 (20:2:3) の混液で展開し、紫外線を照射して緑色のけい光を発する部位の薄層をはがしとり、水で抽出し、抽出液が紫外線によってけい光を発しなくなるまで

Table 5. Determination of 2, 3, 4-Trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic Acid in Commercial Phloxine (Food Red No. 104) with the Fluorometric Method

Sample	2, 3, 4-Trichloro-5, 7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid (%)
1	1.00
2	2.98
3	3.02
4	1.50
5	3.00

同様に操作し、1 N-水酸化ナトリウム溶液 2.5 ml ならびにエタノール 12.5 ml を加えたのち、全量を 25 ml とした。この溶液についてそのけい光強度を測定し、定量を行なった。最初の抽出には水 2 ml を用い、ついで 1 ml ずつで抽出を行なったが、3% 程度含まれる場合には 5 回抽出、1% 程度では 4 回の抽出で十分であった。市販フロキシンからは 1~3.02% の tri-Cl-di-Br-Xanthone が検出された (Table 5)。

なお、フロキシンは、とう赤色のけい光を有し、Fig. 4 に示すような励起ならびにけい光スペクトルを与える。したがって tri-Cl-di-Br-Xanthone の抽出液中にフロキシンが混入することがあっても定量を妨害することはないものとする。

Fig. 4. Fluorescence excitation and emission spectrum of phloxine
 Excitation wavelength: 540 mμ
 Emission wavelength: 555 mμ
 Solvent: 0.1 N Sodium hydroxide solution

結 論

市販のフロキシソ（食用赤色 104 号）中に含まれる緑色けい光性物質，2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid の定量法として紫外外部吸収法ならびにけい光法についての検討を行なった。

本物質は紫外外部吸収法を用いる場合には，0.1 N 水酸化ナトリウム溶液において極大吸収波長 251 m μ で 1~10 μ g/ml，368 m μ で 1~20 μ g/ml の範囲で直線性があり，また，0.2 N 水酸化ナトリウム溶液+エタノール (1:1) の混液においても同様に直線性を示すが極大吸収が波長 368 m μ から 383 m μ にシフトすることが認められた。

けい光法を用いる場合には 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液ならびに 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液+エタノール (1:1) の混液において 1×10^{-7} M~ 4×10^{-6} M の範囲で直線性を示すことがわかった。

本物質は薄層クロマトグラフィーを用いて定量する場合，紫外外部吸収法ならびにけい光法いずれも満足すべき結果を与えるが，けい光法を用いての定量はより選択的であると考え，薄層上における検出限界は紫外線下において絶対量として 0.01 μ g であった。薄層クロマトグ

ラフ法を用いて市販フロキシソ中の緑色けい光性物質の定量を行なったところ 1~3.02% の 2,3,4-trichloro-5,7-dibromo-6-hydroxyxanthone-1-carboxylic acid が検出された。

終りに臨み，本研究について種々ご指導を賜わり，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食品添加物部長谷村顕雄博士ならびに同所薬品部長井上哲男博士に対し，お礼申し上げます。

なお，本研究は日本薬学会第89年会（昭和44年4月5日，名古屋）において発表。

文 献

- 1) 神蔵美枝子：食衛誌，**10**，86 (1969).
- 2) 神蔵美枝子：同上，**9**，348 (1968).
- 3) 神蔵美枝子：同上，**8**，427 (1967).
- 4) J. G. Kirchner, J. M. Miller, R. G. Rice: J. Agr. and Food Chemistry, **2**, 1031 (1954).
- 5) W. L. Stanley, S. H. Vannier, B. Gentili: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, **40**, 282 (1957).
- 6) J. D. Few, T. J. Forward: J. Chromatog., **36**, 63 (1968).