4-アミノアンチピリンによるクロルフェノール類の定量 (第2報)

薄層クロマトグラフィーによる検出

(昭和 39 年 5 月 11 日 受 理)

近 藤 竜 雄* 川 城 巖*

Determination of Chlorophenols with 4-Aminoantipyrine (II) Detection by Thin-layer Chromatography

Tatsuo KONDO and Iwao KAWASHIRO

(National Institute of Hygienic Sciences:
2-chome, Tamagawayoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo)

The coloring matters formed by the color reaction between chlorophenols and 4-aminoantipyrine were separated on silica gel.

Glass plates coated with "Silica gel G" to a thickness of 250μ were dried in an oven at 110° for 1 hour.

The mixture of the coloring matters(CHCl_3 extracts, $0.01\sim 0.03\mu\text{g}$ as each chlorophenol) was introduced by means of a micropipette at a corner 1.5 cm from the lower edge of the plate and developed with the solvent mixtures (see Table 1, 2) until the solvent front reached a distance of 10 cm from the starting point on the plate.

As each spot gives a red color or orange color, this method has no need of detection reagent.

The coloring matters were isolated and it was confirmed that the couplings of 4-aminoantipyrine with the chlorophenols take place in the position para to phenolic OH group by Ultraviolet absorption spectra, Visible absorption spectra, Infrared absorption spectra and thin-layer chromatography of the coloring matters.

(Received May 11, 1964)

著者らは前報¹⁾で食品中の2,4,5-トリクロルフェノールの定量について検討した。その際試料をリン酸酸性で水蒸気蒸留したのち、留液を水酸化ナトリウムアルカリ性としてエーテル抽出することにより定量妨害物質を除去したのち、pH 7.8(リン酸で調節)で4%フェリシアン化カリウム0.3 ml 存在下で1% 4-アミノアンチピリン0.5 ml と反応させ5分後クロロホルム20 ml で抽出し、このクロロホルム抽出物を用いて分光光度法(480 μm)により定量する方法を確立したが、これを定量する際フェノールあるいは他のクロルフェノール類が存在すれば同様の呈色(橙色)を示して妨害(ただしペンタクロルフェノールは上記の条件では呈色(緑青色)は特

異的であるが発色後退色が激しいので、多量に存在しないかぎり影響がない)し、ろ紙クロマトグラフィーによってこれら呈色物は一部を除き分離できなかった。そこで今回はフェノールおよび11種のクロルフェノール類の4-アミノアンチピリンによる呈色のクロロホルム抽出物を用いて薄層クロマトグラフィーを行ない、フェノールおよびクロルフェノール類の分離検出を試みた。

実験方法および結果

薄層クロマトグラフィーによる検出

試料: フェノールあるいはクロルフェノール類20 μg ずつをそれぞれメスフラスコにとり、リン酸塩緩衝液(pH 7.8) 30 ml を加え水で約90 ml とし、つぎに1% 4-アミノアンチピリン0.5 ml および4%フェリシアン化カリウム0.3 ml を加え全容100 ml とし5分間放置後

* 国立衛生試験所食品部: 東京都世田谷区玉川用賀町

直ちにクロロホルム 2 ml で 1 分間激しく振とうしたのち静置し、クロロホルム層を採取し試料とする。

試薬：前報¹⁾ 記載のものを使用

展開操作：吸着剤として Silica gel G (Merck 社製、硫酸カルシウム 13% 含有) を用い 250 μ の厚さにひき、110° で 1 時間乾燥したものを用いプレートの下端から 1.5 cm のところに 1 cm の間隔に試料 1~3 μ l ずつ (フェノールあるいはクロルフェノール類としてのおおの 0.01~0.03 μ g に相当) ミクロピペットでスポットし後述の溶媒によって展開距離 10 cm で行なった。結果は Table 1, 2 に示したが、Solvent 1~4 は R_f が非常に安定しており好結果が得られるが、2,3-ジクロルフェノールと 2,4,6-トリクロルフェノールが分離しない。Solvent 5 はスポットがよくまとまっているので R_f 値が 0.01 違っても分離する。これも 2,3-ジクロルフェノールと 2,4,6-トリクロルフェノールが分離しない。

Solvent 6, 7 は Solvent 1~5 で分離できなかった 2,3-ジクロルフェノールと 2,4,6-トリクロルフェノールが分離されるが、3,4-ジクロルフェノールと 2,4,6-トリクロルフェノールは分離悪く 2,4,5-トリクロルフェノールと 2,3-ジクロルフェノールが分離しない。Solvent 8 は 2,3-ジクロルフェノールと 2,4,6-トリクロルフェノールは分離せず、2,3,4,6-テトラクロルフェノールと 2,4,5-トリクロルフェノールはスポットが重なり分離が悪い。Solvent 9 および 10 はいずれも原点を動かない。以上の溶媒を用いて同一呈色物を生じるもの以外は分離検出できた。

各呈色物の単離

下記により得られたものは 4-アミノアンチピリンによるフェノールおよびクロルフェノール類の呈色のクロロホルム抽出物を薄層クロマトグラフィー (Solvent 5) により分離したのち、スポットをけずりとリクロホルムで抽出、クロロホルムを留去して得た残渣をメタノールより再結晶して得られたものとそれぞれ同一物であることを赤外、可視および紫外吸収スペクトルあるいは混融試験により確認した。

p-chlorophenol あるいは phenol と 4-aminoantipyrine との反応物

p-chlorophenol 0.27 g (あるいは phenol 1 g, 以下かつこ内は phenol を原料としたときの数値) を水 200 ml (200 ml) およびリン酸塩緩衝液 350 ml (300 ml) に溶解し、かきまぜながらこれに 4-aminoantipyrine 1.2 g (3.5 g) および 20% K₃Fe(CN)₆ 13 ml (35 ml) を加え、5 分間放置後析出した沈殿をろ水洗す。メタノール

より再結晶し、黄味赤色リン片状晶 0.24 g (0.38 g) を得る。mp 157~158° (decomp.) Beilstein 反応陰性, C₁₇H₁₅N₃O₂ Anal. Calcd.: C 69.61; H 5.15; N 14.33. Found: C 69.16; H 5.06; N 14.05. $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ m μ (log ϵ): 456 (4.28).

2,4-dichlorophenol あるいは *o*-chlorophenol と 4-aminoantipyrine との反応物

2,4-dichlorophenol 0.3 g (あるいは *o*-chlorophenol 0.6 g, 以下かつこ内は *o*-chlorophenol を原料としたときの数値) を水 200 ml (メタノール 10 ml) およびリン酸塩緩衝液 350 ml (300 ml) に溶解、かきまぜながらこれに 4-aminoantipyrine 1.2 g (1.9 g) および 20% K₃Fe(CN)₆ 13 ml (18 ml) を加え 5 分間放置後析出した沈殿をろ水洗す。メタノールより再結晶。黄味赤色粉末 0.32 g (0.06 g) を得る。mp 151~152° (decomp.) Beilstein 反応陽性, C₁₇H₁₄N₃O₂Cl Anal. Calcd.: C 62.29; H 4.30; N 12.82; Cl 10.82. Found: C 61.84; H 4.14; N 13.26; Cl 10.93. $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ m μ (log ϵ): 470 (4.42).

3,4-dichlorophenol あるいは *m*-chlorophenol と 4-aminoantipyrine との反応物

3,4-dichlorophenol 0.25 g (あるいは *m*-chlorophenol 0.6 g, 以下かつこ内は *m*-chlorophenol を原料としたときの数値) を水 200 ml (メタノール 10 ml) およびリン酸塩緩衝液 350 ml (300 ml) に溶解、かきまぜながらこれに 4-aminoantipyrine 1 g (1.9 g) および 20% K₃Fe(CN)₆ 12 ml (18 ml) を加え 5 分間放置後析出した沈殿をろ水洗す。メタノールより再結晶。深赤あるいは赤茶色結晶性粉末 0.16 g (0.15 g) を得る。mp 161~162° (decomp.) Beilstein 反応陽性, C₁₇H₁₄N₃O₂Cl Anal. Calcd.: C 62.29; H 4.30; N 12.82; Cl 10.82. Found: C 62.63; H 4.16; N 13.15; Cl 10.57. $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ m μ (log ϵ): 464 (4.36).

2,4,5-trichlorophenol あるいは 2,5-dichlorophenol と 4-aminoantipyrine との反応物

Table 1. Rf Values of Coloring Matters Produced by 4-Aminoantipyrine Reagent
(Development distance 10 cm. The approximate development times for each solvent are given in parentheses)

Compound	Solvent				
	1 (33 min)	2 (23 min)	3 (19 min)	4 (18 min)	5 (18 min)
Phenol	0.33	0.21	0.18	0.15	0.23
<i>o</i> -Chlorophenol	0.48	0.37	0.32	0.28	0.28
<i>m</i> -Chlorophenol	0.55	0.43	0.37	0.33	0.30
<i>p</i> -Chlorophenol	0.33	0.21	0.18	0.15	0.23
2,3-Dichlorophenol	0.62	0.51	0.46	0.40	0.35
2,4-Dichlorophenol	0.48	0.37	0.32	0.28	0.28
2,5-Dichlorophenol	0.70	0.59	0.53	0.48	0.39
2,6-Dichlorophenol	0.62	0.51	0.46	0.40	0.35
3,4-Dichlorophenol	0.55	0.43	0.37	0.33	0.30
2,4,5-Trichlorophenol	0.70	0.59	0.53	0.48	0.39
2,4,6-Trichlorophenol	0.62	0.51	0.46	0.40	0.35
2,3,4,6-Tetrachlorophenol	0.74	0.63	0.58	0.54	0.42

Solvents: 1 =benzene/isoamyl alcohol (1 : 1)
 2 =benzene/isoamyl alcohol (2 : 1)
 3 =benzene/isoamyl alcohol (3 : 1)
 4 =benzene/isoamyl alcohol (4 : 1)
 5 =chloroform/ethanol (70 : 2)

Table 2. Rf Values of Coloring Matters Produced by 4-Aminoantipyrine Reagent
(Development distance 10 cm. The approximate development times for each solvent are given in parentheses)

Compound	Solvent				
	6 (17 min)	7 (20 min)	8 (75 min)	9 (14 min)	10 (25 min)
Phenol	0.16	0.27	0.15	No movement	No movement
<i>o</i> -Chlorophenol	0.21	0.33	0.25	"	"
<i>m</i> -Chlorophenol	0.24	0.37	0.36	"	"
<i>p</i> -Chlorophenol	0.16	0.27	0.15	"	"
2,3-Dichlorophenol	0.31	0.44	0.39	"	"
2,4-Dichlorophenol	0.21	0.33	0.25	"	"
2,5-Dichlorophenol	0.31	0.44	0.49	"	"
2,6-Dichlorophenol	0.26	0.40	0.39	"	"
3,4-Dichlorophenol	0.24	0.37	0.36	"	"
2,4,5-Trichlorophenol	0.31	0.44	0.49	"	"
2,4,6-Trichlorophenol	0.26	0.40	0.39	"	"
2,3,4,6-Tetrachlorophenol	0.33	0.46	0.50	"	"

Solvents: 6 =benzene/methanol (30 : 2)
 7 =benzene/methanol (30 : 5)
 8 =carbon tetrachloride/isoamyl alcohol (1 : 1)
 9 =benzene
 10 =carbon tetrachloride

2,4,5-trichlorophenol 0.25 g (あるいは 2,5-dichlorophenol 0.3 g, 以下カッコ内は 2,5-dichlorophenol を原料としたときの数値) を水 200 ml (220 ml) およびリン酸塩緩衝液 350 ml (380 ml) に溶解, かきまぜながらこれに 4-aminoantipyrine 1 g (1.2 g) および 20% $K_3Fe(CN)_6$ 12 ml (14 ml) を加え 5 分間放置後析出した沈殿をろ取水洗す。メタノールより再結晶。暗紫赤色針状晶 0.22 g (0.4 g) を得る。mp 178~179° (decomp.). Beilstein 反応陽性。 $C_{17}H_{18}N_8O_2Cl_2$ Anal. Calcd.: C 56.37; H 3.62; N 11.60; Cl 19.58. Found: C 56.01; H 3.56; N 11.50; Cl 19.59. $\lambda_{max}^{CHCl_3} m\mu$ (log ϵ): 478 (4.51).

2,4,6-trichlorophenol あるいは 2,6-dichlorophenol と 4-aminoantipyrine との反応物

2,4,6-trichlorophenol 0.25 g (あるいは 2,6-dichlorophenol 1 g, 以下カッコ内は 2,6-dichlorophenol を原料としたときの数値) を水 200 ml (メタノール 50 ml) およびリン酸塩緩衝液 350 ml (400 ml) に溶解, かきまぜながらこれに 4-aminoantipyrine 1 g (2.6 g) および 20% $K_3Fe(CN)_6$ 12 ml (26 ml) を加え 5 分間放置後析出した沈殿をろ取水洗す。メタノールより再結晶。赤色針状晶

0.28 g (1 g) を得る。mp 169~170° (decomp.).

Beilstein 反応陽性。 $C_{17}H_{18}N_8O_2Cl_2$ Anal. Calcd.: C 56.37; H 3.62; N 11.60; Cl 19.58. Found: C 56.00; H 3.82; N 11.26; Cl 19.21. $\lambda_{max}^{CHCl_3} m\mu$ (log ϵ): 484 (4.53).

なお, 2,3-dichlorophenol からは同様の方法で深紫赤色結晶性粉末 mp 182~183° (decomp.) $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ (log ϵ): 475 (4.45) を得る。

考 察

本法によるフェノールおよびクロルフェノール類の検出は上述の Table 1 および 2 の Solvent 1~8 によりスポットが非常によくまとまり, きわめて鋭敏でたとえば Solvent 5 を用いれば 2,4,5-トリクロルフェノールとして 0.005 μg を検出でき, しかも呈色物が橙一赤であるので同一呈色物を生ずるもの以外はそのまま簡単に分離され, 食品中に微量に含まれるフェノールおよびクロルフェノール類の検出に利用できる。なお, フェノールと *p*-クロルフェノール, *o*-クロルフェノールと 2,4-ジクロルフェノール, *m*-クロルフェノールと 3,4-ジクロルフェノール, 2,5-ジクロルフェノールと 2,4,5-トリクロルフェノール, 2,6-ジクロルフェノールと 2,4,6-トリクロルフェノールはそれぞれ同一呈色物を生ずることを呈色物を単離して確認し, Emerson の推定²⁾を確認した。

終りに, 元素分析をお願いした東京大学薬学部中央分析センター木村栄作氏および東京薬科大学女子部元素分析室の諸氏, IR 測定を担当された当所大場博士に感謝いたします。

本報告は第19回日本薬学会大会衛生化学・公衆衛生部会 (1964年4月, 東京) で発表した。

文 献

- 1) 近藤竜雄, 川城巖: 食衛誌. 5, 372 (1964).
- 2) E. Emerson: J. Org. Chem. 8, 417 (1943).