薄層クロマトグラフィーによる色素の 分析について (第7報)

キサンテン系色素アルカリ分解物について その 2
ジブロムフルオレセインについて

(昭和 42 年 7 月 10 日受理)

神 蔵 美 枝 子*

Thin Layer Chromatography of Synthetic Dyes (VII) On the Decomposition Products of Xanthene Dyes (2) Dibromofluoresceine

Mieko KAMIKURA

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

When dibromofluoresceine is hydrolyzed with 50 % sodium hydroxide solution, it yields 2-bromoresorcinol and 2-(3'-bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid. The structures of these two products have been clarified by the measurement of their melting points respectively, and their infrared and nuclear magnetic resonance spectra. These two products could be separated each other on a thin layer of silica gel, using a solvent system of isopropyl ether + glacial acetic acid (10 : 0.1). The location of the spots was achieved, using diazotized sulfanilic acid as a chromogenic agent.

Various solvent combinations were examined for the separation of resorcinol, 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, and their bromine derivatives. The solvent system of chloroform + glacial acetic acid (4 : 1) gave the best result. One of the developing solvents examined was dichloromethane, which was found to give the best separation for resorcinol and its bromine derivatives. There was a linear relationship between the R_f values and the number of bromine in these compounds. The compounds studied and R_f values obtained by use of four solvent systems are given in Table 3.

(Received July 10, 1967)

まえがき

さきに、フルオレセインならびにエオシンのアルカリ分解成績体の薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す) について検討し、これらの色素の分解成績体を容易に分離確認できることを述べたり¹⁾、そこで、さらにジブロムフルオレセインの分解成績体について同法を試み、また、その分解成績体ならびに関連物質の TLC の結果から化学構造と R_f との間に興味ある関係を見いだしたので、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

4,5-ジブロムフルオレセイン: 本品はフルオレセインを臭素化して製するが、その製造は比較的困難である

とされ、副色素を多量に含む場合が多い。市販のジブロムフルオレセインは既報¹⁾のメチルエチルケトン + 水 (20 : 1.0) で展開すると 2~5 のスポットが現われる (Fig. 1)。Fig. 1 のクロマトグラムの結果から試料 No. 4 が比較的副色素が少ないことがわかったのでこの色素について実験を行なった。なお試料 No. 4 は D & C Orange No. 5 よりも色素自体の品質は良好であった。

(2) 試薬および装置

第 6 報²⁾に準じた。

吸着剤: カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (メルク)

実験方法

(1) プレーートの作製

第 6 報²⁾に準じた。

(2) 検出法

* 国立衛生試験所食品添加物部: 東京都世田谷区玉川用賀町 2-203

Fig. 1. Thin layer chromatogram of dibromofluoresceine

1, 2, 4~7: Commercial Products, 3: D & C Orange No. 5, 8: Eosine
Developing solvent: Methyl ethyl ketone + H₂O (20 : 1.0)

Adsorbent: Silica gel D 5 (Camag)

Spot that gave yellowish orange color after the developing are encircled by continuous lines, and spot which gave light purplish red color by broken line

第6報²⁾に準じた。

(3) 試料の分解

第6報²⁾に準じて行なった。加熱後約10分で紫色となり、ついでかっ色の液を得た(反応時間約3 hr)。ただし、試料は5 gを用いた。

実験結果および考察

(1) 分解成績体

ジブロムフルオレセインのアルカリ分解についてはすでに Harris ら³⁾, Sandin ら⁴⁾, 長瀬⁵⁾により、2-bromoresorcinol と 2-(3'-bromo-2',4'-dihydroxy-benzoyl)-benzoic acid (以下 (2'-4'-diOH-3'-BrBBA と略す) が得られることを報告している (Table 1)。し

かし、既知の 2-bromoresorcinol は 5-nitro- β -resorcylic acid より出発し、その臭素化、-NO₂ 基の -NH₂ 基への還元を経るなど数工程の反応ののちに得られる。そして純品は融点、塩化第二鉄による呈色など種々の反応により確かめられる。臭素誘導体はその融点がきわめて類似しているところから既知物質との混融試験が不可欠の方法とされている。本実験では4,5-ジブロムフルオレセインの分解成績体を再結晶法により精製し、赤外吸収スペクトル(以下 IR スペクトルと略す)、核磁気共鳴スペクトル(以下 NMR スペクトルと略す)により臭素の結合位置などを確かめた。

試料の分解によって得た反応液について第6報²⁾に準じて行なうと、Fraction I から、かっ色油状物質 0.6 g (34.1%)、Fraction II から、かっ色微細な結晶 2.4 g (76.2%) を得た。

Fraction I および II はジオキサン + ベンゼン + 氷酢酸 (25 : 96 : 4) で展開すると Fig. 2 に示すようなクロマトグラムを与える。この結果から Fraction I 中には Fraction II に移行すべき物質も含まれていることがわかった。そこで Fraction I についてカラムクロマトグラフィーによる分離精製を検討した。すなわち、シリカゲルのカラムを用い、クロロホルム + エーテル (3 : 1) で展開するとき、溶出液の 5 ml ずつの分画において No. 1~7 までに大きな R_f に相当する物質が溶出した。この溶出液を濃縮し、氷冷すると帯かつ白色の針状結晶を析出した。また、この物質は同様なカラムにおいてクロロホルム + エーテル (1 : 1) で展開するとき、溶出液の滴下するカラム管の壁に白色結晶として析出するので、純品を容易に得ることもできた。融点は 103.6° で文献値 (102~3°) とよく一致した。紫外外部吸収スペク

Table 1. Decomposition Products of Dibromofluoresceine Produced by Heating with 50 % Sodium Hydroxide Solution

Dye	Structure	Decomposition product	mp (°C) (Reference)
Dibromofluoresceine (C. I.* 45370 A)		2-Bromoresorcinol	102.5 (1) 100 (2)
		2-(3'-Bromo-2',4'-dihydroxy-benzoyl)-benzoic acid	200 (2) 201~202 (3)

* Color Index number (1956)

Reference: (1) = C. P. Rice: J. Am. Chem. Soc. 48, 3127 (1926)

(2) = R. M. Harris, G. J. Marriot, J. C. Smith: J. Chem. Soc. 1936, 1843

(3) = 長瀬雄三, 大野武男, 松本 潮: 岐阜薬大, 2, 24 (1952)

Fig. 2. Thin layer chromatograms of the decomposition products of dibromofluoresceine

- 1: Fraction I, 2: Fraction II,
3: 2-Bromoresorcinol,
4: 2-(3'-Bromo-2', 4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid

Developing solvent:

A = Dioxane + Benzene + Glacial acetic acid (25 : 90 : 4)

B = Isopropyl ether + Glacial acetic acid (10 : 0.1)

Chromogenic agent: Diazotized sulfanilic acid

Adsorbent: Silica gel D5 (Camag)

Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of 2-bromoresorcinol in ethanol solution
Concn.: — 40 mg/L, --- 5 mg/L

Fig. 4. Infrared absorption spectrum of 2-bromoresorcinol (KBr)

Fig. 5. Nuclear magnetic resonance spectrum of 2-bromoresorcinol in DMSO- d_6 at 60 Mc/sec

トル (以下 UV スペクトル と略す) (Fig. 3) は $\lambda_{\max}$, 276 $m\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 91$) に極大吸収を有し, resorcinol のそれ²⁾と比較すると臭素基の導入による深色効果はみられず, また淡色的である. IR スペクトル (Fig. 4) は 3350 cm^{-1} に ν_{OH} , 1185 cm^{-1} に $\nu_{\text{C-O}}$, 770 cm^{-1} に 1, 2, 3 位置換ベンゼンによる吸収を示す. NMR スペクトルは AB_2 型の吸収を芳香環水素の吸収領域に示し, 一次解析の結果得られた結合定数 8.0 cps はその構造とよく

あう (Table 2, No. 1). ケミカルシフトはスピン・スピン結合定数の値から一義的に帰属できる.

以上の結果から Fraction I より得られた物質は 2-bromoresorcinol であることが確かめられた.

Fraction II は 35% 酢酸から再結晶するとかすかにかっ色を帯びた微細な結晶が得られた. 融点は 205° で文献値 ($201 \sim 202^\circ$) とほとんど一致した. UV スペクトル (Fig. 6) は $\lambda_{\max}$ 216 $m\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 789$) に極大吸収を有

Table 2. Chemical Shifts and Coupling Constants^{a)} of 2-Bromo-, 4-Bromo-, 2,4,6-Tribromoresorcinol and 2-(3'-Bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid

No.	Compound	ν_a	ν_b	ν_c	$\nu_d^{b)}$	J_{sp}
1		—	6.42	6.92	6.42	$J_{bc} = J_{dc} = 8.0$
2		6.50	—	7.23	6.23	$J_{ac} \div 0$ $J_{ad} = 2.8$ $J_{dc} = 8.7$
3		—	—	7.70	—	—
4		—	6.53	6.98	—	$J_{bc} = 8.7$

a) All NMR spectra were determined with a Varian Model A-60 spectrometer in solution of DMSO- d_6 containing a little amount of TMS as an internal reference at room temperature

b)

し、これは $-\text{COOH}$ 基の吸収と一致する。291 $m\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 426$) にみられる吸収は $> \text{CO}$ 基の吸収と考えられる。2',4'-diOHBBA のそれ^{b)}と比較すると臭素基の導入による深色効果がみられるが、やや淡色的である。IR スペクトル (Fig. 7) は 3400 cm^{-1} 付近に ν_{OH} , 1885 cm^{-1} に ν_{COO} , 1615 cm^{-1} に $\nu_{\text{C=O}}$, 1285~1312 cm^{-1} に 2本の吸収帯があるが、これらは $\nu_{\text{C-O}}$ によるものと考えられる。MMR スペクトル (Fig. 8) は典型的な phthaloyl 基の複雑な吸収^{*1}の他に AB 型の吸収を示している。それぞれの二重線の間隔から求めた結合定数 8.7 cps は互いに ortho 位にある水素の示す値であり、すなわち Table 2, No. 4 の構造を支持する^{*2}。

以上の結果から Fraction II より得られた物質は 2',4'-diOH-3'-BrBBA であることが確かめられた。

(2) 標品の合成

a) 4-Bromoresorcinol

文献記載の方法⁶⁾に従い 5-bromo-2,4-dihydroxy-

*1 第6報：食衛誌。8, 427 (1967) の Fig. 5, Fig. 12 参照。

*2 これら関連物質の NMR スペクトルの帰属については第8報に若干述べる。

Fig. 6. Ultraviolet absorption spectrum of 2-(3'-bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid in ethanol solution (1.1 mg/L)

Fig. 7. Infrared absorption spectrum of 2-(3'-bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid (KBr)

Fig. 8. Nuclear magnetic resonance spectrum of 2-(3'-bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid in DMSO- d_6 at 60 Mc/sec

benzoic acid から調製した。融点は 103.3° で文献値 (103°) とよく一致した。UV スペクトル (Fig. 9) は $\lambda_{\max}$, $286\text{m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 163$) に極大吸収を有し, resorcinol のそれと比較すると臭素基の導入によって相当大きな深色効果が現われているが, 淡色的である。この場合には 2-bromoresorcinol よりも臭素基の導入による深色効果は大きく, その淡色移動も小さい。IR スペクトル (Fig. 10) は 3480cm^{-1} と 3300cm^{-1} に ν_{OH} , 1160cm^{-1} に $\nu_{\text{C-O}}$, 830cm^{-1} に 1,2,4 位置換ベンゼンによる吸収を示す。NMR スペクトル (Fig. 11) は非等価な三つの芳香環水素の存在を示しており, 一次解析の結果得た二つの結合定数 8.7, 2.8 cps はそれぞれ ortho, meta カップリングの値と考えてよく, また para カップリングがほぼ観測されるのも Table 2, No. 2 の構造をよく説明する。ケミカルシフトはスピン・スピン結合定数の値から一義的に帰属できる。

以上の結果から合成品は 4-bromoresorcinol であることが確かめられた。

b) 2,4,6-Tribromoresorcinol

Davis ら⁷⁾の方法に従って resorcinol 5g をクロロホルムに懸濁させ, 臭素化して調製し, 6.5g の収量を得た。融点は 113.9° で文献値 (112°) とほとんど一致した。UV スペクトル (Fig. 12) は $\lambda_{\max}$, $299.5\text{m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 92$) に極大吸収を有し, resorcinol のそれと比較すると, 臭素基の導入によって相当大きな深色効果が現われているが淡色的である。IR スペクトル (Fig. 13) は 3480cm^{-1} に ν_{OH} , 1190cm^{-1} に $\nu_{\text{C-O}}$, 862cm^{-1} に 1,2,3,4,5 位置換ベンゼンによる吸収を示す。NMR スペクトル (Fig. 14) はただ一つの芳香環水素の存在を示している。このスペクトルだけでその構造を帰納すること

Fig. 9. Ultraviolet absorption spectra of 4-bromoresorcinol in ethanol solution
Concn.: — 40 mg/L, --- 5 mg/L

Fig. 10. Infrared absorption spectrum of 4-bromoresorcinol (KBr)

はできないが, 芳香環水素のケミカルシフトの加成性がほぼなりたっていると仮定すればおそらく間違いないであろう。2-bromoresorcinol 中 H^b を臭素に置換すると H^c, H^d のケミカルシフトはそれぞれ $+0.43, -0.05\text{ppm}$ だけ変化する^{*3}。それゆえ H^b, H^d を同時に臭素に換えれば H^c のケミカルシフトは 2-bromoresorcinol のそれよりも約 0.8ppm 低磁場に動くことと予想されるが, これは Table 2, No. 3 の実測値 $+0.78$ とよく一致す

^{*3} 第6報, Fig. 9 参照。

Fig. 11. Nuclear magnetic resonance spectrum of 4-bromoresorcinol in $\text{DMSO}-d_6$ at 60 Mc./sec

Fig. 12. Ultraviolet absorption spectra of 2,4,6-tribromoresorcinol in ethanol solution
Concn.: — 40 mg/L, --- 5 mg/L

Fig. 13. Infrared absorption spectrum of 2,4,6-tribromoresorcinol (KBr)

Fig. 14. Nuclear magnetic resonance spectrum of 2,4,6-tribromoresorcinol in $\text{DMSO}-d_6$ at 60 Mc./sec

る。すなわち、その構造は正しいであろう。以上の結果から合成品は 2,4,6-tribromoresorcinol であることが確かめられた。

(3) アルカリ分解成績体ならびに関連物質の TLC による分離確認

第 6 報²⁾ で得られた 2-4-dibromoresorcinol, 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 2-(3',5'-dibromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid ならびに本実験で得た 2-bromoresorcinol, 2',4'-diOH-3'-BrBBA および合成によって得た 4-bromoresorcinol, 2,4,6-tribromoresorcinol についてシリカゲルのプレートを用い展開剤の検索を行なった。その結果 resorcinol およびその臭素誘導体の分離にはジクロルメタンが最も良好な結果を与えることを見いだした。この場合 resorcinol, 2-bromoresorcinol, 2,4-dibromoresorcinol, 2,4,6-tribromoresorcinol についてはその Rf と置換臭素の数との間に直線性があることを認めた (Fig. 15)。しかもこの展開剤を用いるときは dihydroxybenzoyl benzoic acid 系の物質は全く移動せず、両系の物質の識別も容易であった。しかし、resorcinol は原点にとどまった。そこでさらに展開剤を検討したところ、クロホルム + 氷酢酸 (4:1) により resorcinol 系ならびに dihydroxybenzoyl benzoic acid 系の両者を分離することができた。本展開剤を用いるときもジクロルメタンの場合と同様に Rf と置換臭素の数との間に直線性があることがわかった (Fig. 15)。

アルカリ分解成績体ならびに関連物質の Rf を Table 2 に、クロマトグラムを Fig. 16~17 に示す。

Table 3. Rf Values of Resorcinol, 2-(2',4'-Dihydroxybenzoyl)-benzoic Acid and their Bromine Derivatives

No.	Compound	Dioxane 25 Benzene 90 Glacial acetic acid 4	Diachloromethane	Isopropyl ether 10 Glacial acetic acid 0.1	Chloroform 4 Glacial acetic acid 1
1	Resorcinol	0.30	0.0	0.38	0.20
2	4-Bromoresorcinol	0.33	0.03	0.36	0.34
3	2-Bromoresorcinol	0.40	0.15	0.50	0.49
4	2,4-Dibromoresorcinol	0.47	0.27	0.52	0.63
5	2,4,6-Tribromoresorcinol	0.55	0.37	0.55	0.76
6	2-(2',4'-Dihydroxybenzoyl)-benzoic acid	0.27	0.0	0.30	0.34
7	2-(3'-Bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid	0.32	0.0	0.28	0.54
8	2-(3',5'-Dibromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid	0.41	0.0	0.43	0.70

Fig. 15. Relationship between Rf values and the number of bromine in resorcinol and 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid

Developing solvent:

- Dichloromethane
- Chloroform + Glacial acetic acid (4:1)

なお、展開剤の検索中につぎのことが観察された。すなわち展開剤中に氷酢酸を加えると dihydroxybenzoyl benzoic acid 系の物質のスポットはコンパクトなスポットを形成するが、氷酢酸を含まない組成の展開剤では一般にテーリングを生ずる傾向があった。

第 6 報²⁾ においてエオシンの分解成績体の Fraction I

Front

Fig. 16. Thin layer chromatogram of resorcinol, 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid and their bromine derivatives

1 = Resorcinol, 2 = 4-Bromoresorcinol, 3 = 2-Bromoresorcinol, 4 = 2,4-Dibromoresorcinol, 5 = 2,4,6-Tribromoresorcinol, 6 = 1+2+3+4+5, 7 = 2-(3',5'-Dibromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 8 = 2-(3'-Bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 9 = 2-(2',4'-Dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 10 = 7+8+9

Developing solvent: Dichloromethane,

Adsorbent: Silica gel D 5 (Camag)

Chromogenic agent: Diazotized sulfanilic acid

は TLC の結果から Rf 約 0.4 のところにスポットが認められることを述べたが、本研究において、そのスポットを与える物質は 2-bromoresorcinol であることが判明した。

ジアゾ化スルファニル酸による呈色は bromoresorcinol 系ならびに 2',4'-diOH-3'-BrBBA とともに第 6 報²⁾の色調と同じであった。

なお、展開に要する時間はジオキササン + ベンゼン + 氷酢酸 (25:90:4) が 60 分、ジクロロメタンが 45 分、イソプロピルエーテル + 氷酢酸 (10:0.1) が 50 分、クロロホルム + 氷酢酸 (4:1) が 60 分であった。

結 論

ジブromフルオレセインのアルカリ分解液から 2-bromoresorcinol ならびに 2',4'-diOH-3'-BrBBA を単離し、これらの物質についてシリカゲルのプレートを用い、イソプロピルエーテル + 氷酢酸 (10:0.1) により TLC を行ない両者を分離することができた。また、resorcinol およびその臭素誘導体ならびに 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid およびその臭素誘導体の TLC による分離確認について検討したところ、展開剤としてジクロロメタンが前者の物質の分離に、クロロホルム + 氷酢酸 (4:1) が両系の物質の分離にすぐれていることを見いだした。これらの展開剤を用いるとき、その Rf と置換臭素の数との間に直線性があることがわ

Front

Fig. 17. Thin layer chromatogram of resorcinol, 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid and their bromine derivatives

1 = Resorcinol, 2 = 4-Bromoresorcinol, 3 = 2-Bromoresorcinol, 4 = 2,4-Dibromoresorcinol, 5 = 2,4,6-Tribromoresorcinol, 6 = 1+2+3+4+5, 7 = 2-(3',5'-Dibromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 8 = 2-(3'-Bromo-2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 9 = 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl)-benzoic acid, 10 = 7+8+9

Developing solvent:

Chloroform + Glacial acetic acid (4:1)

Adsorbent: Silica gel D 5 (Camag)

Chromogenic agent: Diazotized sulfanilic acid

かった。

終りに臨み、本研究について種々指導を賜わり、ご校閲いただいた東京薬科大学教授 藤井清次博士ならびに研究の便宜を与えられご校閲いただいた国立衛生試験所食品添加物部長 井上哲男博士に対し、お礼申し上げます。また、NMR スペクトルの測定、解析にご配慮いただいた味の素株式会社中央研究所 熊代泉博士ならびに甲斐荘正恒氏にお礼申し上げます。

なお、本研究は第 24 回日本薬学会大会 (昭和 42 年 4 月 8 日、京都) において発表。

文 献

- 1) 神蔵美枝子: 食衛誌, 7, 338 (1966).
- 2) 神蔵美枝子: 同上, 8, 427 (1967).
- 3) R. M. Harris, G. J. Marriott, J. C. Smith: J. Am. Chem. Soc. 1936, 1843.
- 4) R. B. Sandin, A. Gillies, S. C. Lynn: J. Am. Chem. Soc. 61, 2919 (1939).
- 5) 長瀬雄三, 大野武男, 松本 潮: 岐阜薬大, 2, 24 (1952).
- 6) A. H. Blatt: "Organic Syntheses", Collective Vol. 2, p. 100 (1963), John Wiley & Sons, Inc. New York.
- 7) T. L. Davis, J. W. Hill: J. Am. Chem. Soc. 51, 501 (1929).