

薄層クロマトグラフィー-けい光濃度法における 粘性有機溶媒を用いる増けい光法

内山 貞夫, 近藤 龍雄, 内山 充*

(1977年5月27日受理)

薄層クロマトグラフィー (TLC)-けい光濃度法において, 展開後のプレートに流動パラフィンやグリセリンのような揮散性のなく粘度の高い有機溶媒を噴霧することによってけい光スポットを増けい光させ定量感度を高める方法を開発した. 定量に当たって目的のスポットに等量噴霧するために, プレート上原点から等 R_f 値を示す位置に均一噴霧が可能な装置を開発した. その結果流動パラフィン溶液を噴霧することにより DNS-アミン {DNS: 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonyl} のけい光スポットを増けい光させジメチルアミンなど揮発性アミンの定量限界を10倍下げることが可能となった. 更に本法はベンゾ(a)ピレンのけい光強度を35倍も増加させるなど他のけい光物質にも有効であり, 有力な増けい光法として大いに期待できる.

1 緒 言

TLC-けい光濃度法はけい光 デンシトメーターの著しい改良, 操作が簡便で廉価であること, クロマトグラフィーの分離を含めた高感度検出が可能なことから実用微量分析法として多方面^{1)~5)}に繁用されているが, 更に検出感度の増加及び精度の確かさが望まれるところである.

著者らは先にジメチルアミンなど揮発性アミンの簡易定量法として, 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonyl chloride (DNSCl) を用いてけい光ラベルした後 TLC-けい光濃度法を行う方法³⁾を報告した. 今回プレート上の DNS-アミンのスポットにグリセリンあるいは流動パラフィンなど揮散性の低い溶媒を噴霧すると, けい光強度が増加し長時間にわたって安定であるという新しい知見を得た. 更に他のけい光物質でも同じ傾向を示すものが多いこと, そして本法は従来の TLC の条件をそのまま利用できる利点があることから揮発性アミン分析を中心に TLC-けい光濃度法の新しい増けい光法を開発した. 更に精度を高めるために増けい光剤の均一噴霧装置を試作し良好な結果を得たので報告する.

2 実 験

2.1 試 薬

塩化アンモニウム及びアミン塩酸塩: 塩化アンモニ

ウム, モノメチルアミン (MMA) 及びジメチルアミン (DMA) 各塩酸塩は試薬特級品. 各標準溶液は塩化アンモニウム及びアミン塩酸塩の水溶液を使用. 有機溶媒: 流動パラフィン及びグリセリンは試薬1級品を, その他の有機溶媒は特級品を蒸留精製したものを使用.

ダンシルクロリド溶液: DNSCl, 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonyl chloride, 生化学工業(株)製試薬をアセトンに溶かし1%溶液とする. 密せんにして -20°C の冷凍庫に保存すれば1か月は使用可能.

2.2 装 置

けい光デンシトメーター: 明日香工業(株)製, OZUMA, SD-92型(けい光測定付属品付き)及び島津製作所(株)製, 二波長クロマトスキャンナー, CS-900型(けい光測定付属品付き).

均一噴霧装置: 速度調整器付きベルトコンベアー, 窒素ガス圧力調整器付き噴射びん及びスリット付き噴霧箱を有する Fig. 1 に示す装置. なお Fig. 2 は噴霧箱の断面図である.

2.3 DNS-アミンの定量法及び均一噴霧法

薄層クロマトグラフィー (TLC) までの操作法は先に報告した方法³⁾に従い, アミンを DNS 化しその反応液の $5\mu\text{l}$ を無けい光性シリカゲルプレート (メルク製, $250\mu\text{m}$, $20\times 20\text{cm}$) にスポットし展開する. 展開溶媒を1時間以上暗所, 室温で放置し揮散させてから, 原点から等 R_f 値の位置に増けい光剤が等しくかかるように噴霧し, 1時間放置した後けい光デンシトメーターでスポットのけい強度 (ピークの面積値, 励起波長: 365nm)

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

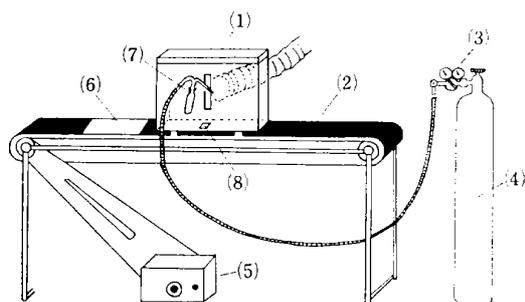


Fig. 1 New spray system

(1) Spray cabinet; (2) Belt conveyor; (3) Pressure regulator; (4) Gas tank; (5) Speed regulator; (6) Plate; (7) Sprayer; (8) Slit

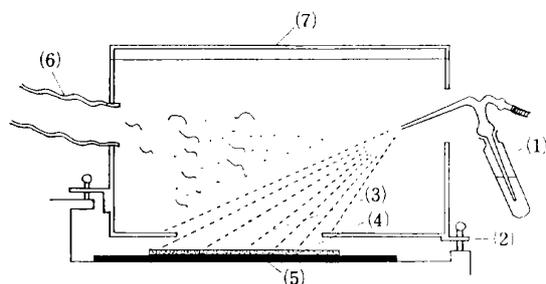


Fig. 2 Sectional diagram of plastic spray cabinet connected to the ventilation flue

(1) Sprayer; (2) Distance controller between a plate and the cabinet; (3) Slit; (4) Plate; (5) Belt conveyor; (6) Suction tube; (7) Cover

を測定する。又、同時に標準溶液について操作し同一プレートで展開し検量線を求め定量する。

なお均一噴霧装置の操作法は以下のようにする。まずベルトコンベアー上のプレートは原点から溶媒先端の方向が噴霧箱のスリットの長軸方向と同方向(ベルトコンベアーの移動方向と直角方向)になるように置く。次に噴射びんの口先を目的とするけい光スポットに効果的に噴霧されるよう方向を設定し、あらかじめ室素圧を調整し一定圧で噴霧を開始してからベルトコンベアーを作動させプレートに増けい光剤を噴霧する。

Table 1 Spray reagents for increasing fluorescence intensity of a spot on a plate

Polarity	Solvent system†
Polar solvent	Glycerol-Ethanol (1:1)
	Glycerol-Methanol (1:1)
Nonpolar solvent	Liquid paraffin-Toluene (2:1)
	Liquid paraffin-Benzene (2:1)
	Liquid paraffin-Hexane (2:1)
	Liquid paraffin-Chloroform (2:1)

† Higher viscous reagents are diluted with lower viscous ones to spray easily.

2.4 増けい光剤

DNS-アミンに対する増けい光剤として主に流動パラフィン-*n*-ヘキサン混液(2:1)を使用した。他の増けい光剤としてグリセリンを中心とする極性溶媒と流動パラフィンを中心とする無極性溶媒系を Table 1 に示す。

3 実験結果と考察

3.1 薄層クロマトグラフィー展開後のけい光強度の変化

一般に展開溶媒がそのまま発けい光のために有効な有機溶媒の場合、TLC 展開後のけい光スポットは展開溶媒の揮散とともにけい光強度が減少するのが肉眼で観察される。そこでけい光剤入り用紙を標準としてスポットのけい光強度と放置時間の関係を調べた。

シリカゲルプレートに 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonamide (DNS-アミン) をスポットし展開した後展開そうから出して室温、暗所で放置し一定時間ごとに相対けい光強度を測定した。Fig. 3 (A) に見られるように展開後から 1 時間急激なけい光強度の減少があり、その後は一定値を保持した。従って、溶媒の影響がなく一定値を与えるのは 1 時間後であることが判明した。

このように揮散性有機溶媒では増けい光作用はあるものの時間とともにプレート上の含有量に変化するし、又

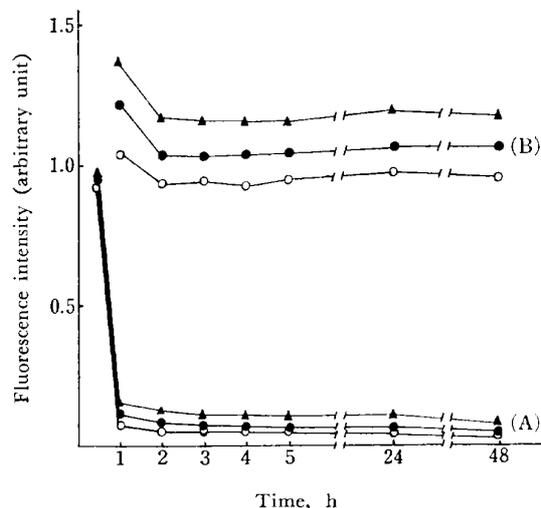


Fig. 3 Change in the fluorescence intensities of 5 nmol/spot of DNS-amines on a silica gel plate

(A) Kept in the dark after development; (B) Sprayed with the reagent immediately after development and after standing for an hour; ● DNS-DMA; ▲ DNS-MMA; ○ DNS-ammonia; Conditions of TLC: Solvent for the development: Acetone-toluene (1:5); Fluorescence-enhancing reagent: Liquid paraffin-*n*-hexane (2:1)

プレート上の位置においても含有量が異なるためにけい光強度にばらつきを生ずることが推定された。

3.2 増けい光剤の効果

展開溶媒の揮散によるけい光強度の大幅な減少という事実から、揮散性の少ない溶媒を噴霧すれば再度けい光強度が高まるものと推論し、流動パラフィンやグリセリンのような揮散性がなく粘度の高い溶媒を増けい光剤として使用することにした。Fig. 3 (B) は展開溶媒が揮散した後のプレートに流動パラフィン-*n*-ヘキサン混液 (2 : 1) を噴霧した結果で、明らかにけい光強度が 10 倍増加しており 48 時間は安定であった。この増けい光作用は薄層プレートがシリカゲルのみならず、ポリアミド系及びセルロース系においても同様に認められ、又けい光デンシトメーターが透過型だけでなく反射型においても同様に観察された。なお流動パラフィンに *n*-ヘキサンを加えて噴霧したのは流動パラフィンそのままでは粘度が高過ぎて噴霧しにくいためである。

3.3 増けい光剤の均一噴霧

TLC-けい光濃度法による定量において、標準溶液と試験溶液を同一プレートにスポットし展開してから目的とする標準物質のけい光スポットと同じ R_f 値を示す位置をけい光デンシトメーターで走査し、同時に試験溶液からのけい光スポットのけい光強度を測定する。従って、増けい光剤は等 R_f 値の位置に等しくかかるよう噴霧しなければならない。

プレート上 DNS-DMA を等量、等間隔にスポットし展開したものをフリーハンドで増けい光剤を噴霧した場合にはスポットのけい光強度の変動係数は 12.42% ($n=7$) であった。このスポットの試薬噴霧前のけい光強度の変動係数は 2.53% ($n=7$) であるので明らかに増けい光の割合が一定していないのが認められる。従来薄層プレートに対する噴霧法は種々あるが、等 R_f 値を示す位置に等しく噴霧する方法はほとんどない。しかし著者らが試作した均一噴霧装置を用いたところ、等しく増けい光され、噴霧後のけい光強度の変動係数が 2.83% ($n=7$) と噴霧前に比べて満足すべき結果を得た。

3.4 増けい光剤の噴霧量

DNS-DMA を等間隔で一直線上にスポットしたプレートに増けい光剤を均一噴霧装置で繰り返し噴霧した結果が Fig. 4 である。噴霧回数を増すに従い増けい光された。2 回噴霧した時点で増けい光は最大に達し、3 回噴霧したものでは 2 回噴霧と変わらないもののプレート

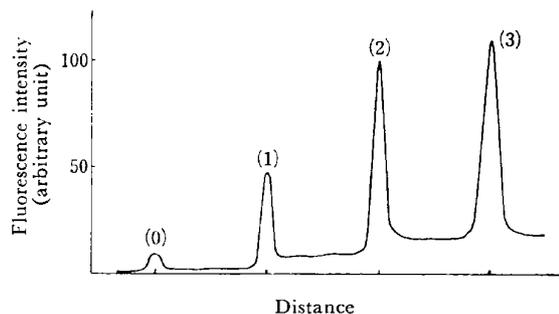


Fig. 4 Relationship between the number of spraying and the fluorescence intensity of 5 nmol/spot of DNS-DMA on a silica gel plate

The number in parenthesis indicates that of spraying. Fluorescence-enhancing reagent : Liquid paraffin-*n*-hexane (2 : 1)

上の増けい光剤は過剰となりけい光スポットは拡大しはじめた。従って、増けい光剤の噴霧量は過剰にならない程度、すなわちプレートが半透明状にぬれてしまわない程度に均一に噴霧する必要があった。

3.5 増けい光剤の選択

本実験で用いたグリセリン系と流動パラフィン系に限ると DNS-アミン類では流動パラフィン系のほうが増けい光作用が強く、けい光スポットの経時的な拡大も少なかった。その他のけい光物質、例えば多環芳香族炭化水素のベンゾ(a)ピレンについて流動パラフィン系は増けい光作用はあるがグリセリン系はほとんどその作用は認められず、発けい光性マイコトキシンの一種オクラトキシンについてはグリセリン系のほうが若干増けい光作用が強かった。このように増けい光剤の選択は事前に種々の増けい光剤を噴霧し最も有効なものを選び出す必要があった。なお増けい光作用の差異は溶媒の粘度、極性、pH など種々考えられるが次報で検討し報告する。

3.6 アンモニア、MMA 及び DMA の定量

アンモニア及び揮発性アミンの回収方法、DNS 化法、TLC などは既報³⁾ に従い操作した後、流動パラフィン-*n*-ヘキサン混液 (2 : 1) を均一噴霧装置で噴霧すると DNS-アミン類のスポットは一様に増けい光し、アンモニア、MMA 及び DMA に関して試験溶液の濃度で表すと各々 ($1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-3}$) M の範囲で濃度とけい光強度の間に直線性を示した。従って、増けい光剤を噴霧しない場合の定量下限 1×10^{-4} M に比べて 10 倍も感度を高めることができた。

Fig. 5 は市販の冷凍エビ中のアンモニア及び揮発性ア

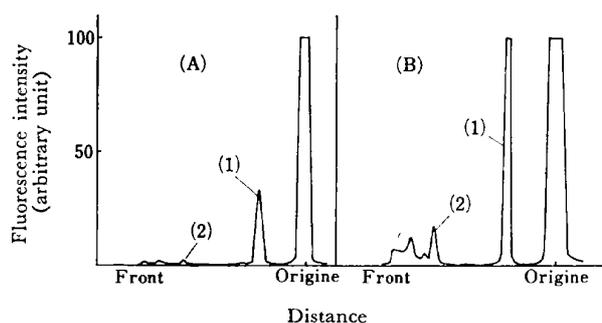


Fig. 5 TLC-fluorodensitometry of DNS-volatile amines derived from frozen shrimp

(A) Before spraying; (B) After spraying; (1) DNS-ammonia; (2) DNS-DMA; Fluorescence-enhancing reagent: Liquid paraffin-*n*-hexane (2:1)

ミンの TLC-けい光濃度法による結果を示したものである。Fig. 5 (B) は本法の増けい光剤の噴霧方向と垂直方向、すなわち原点から溶媒先端方向に均一にかかるように噴霧し、けい光強度の測定も同方向で走査したスキヤノグラフである。この結果から明らかなように増けい光剤を噴霧したものは大きくけい光強度が高まっており、微量の DMA も精度よく含量を求めることができた。

3.7 その他のけい光物質に対する増けい光

DNS-アミンにおいて効果的に増けい光し定量感度を

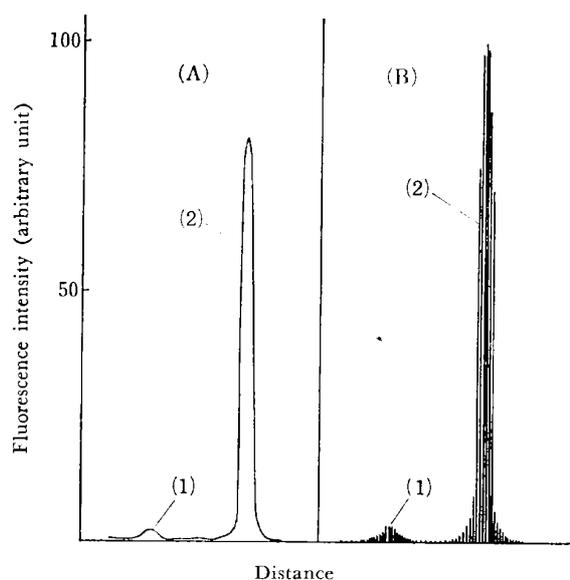


Fig. 6 Fluorescence-enhancing effect of the liquid paraffin solution on benzo(a)pyrene spot on a silica gel plate

(A) Measured by transmission method; (B) Measured by reflection method; (1) Not sprayed; (2) Sprayed; Each spot: 0.4 μ g; Fluorescence-enhancing reagent: Liquid paraffin-*n* hexane (2:1)

高めたことから、他のけい光物質への応用としてベンゾ(a)ピレンについて本法を応用したところ、増けい光剤、流動パラフィン-*n*-ヘキサン混液 (2:1) で実に 35 倍もけい光強度を高めることができた。なお Fig. 6 に示すように透過型及び反射型けい光デンシトメーターによる測定において、両者とも増けい光して観察された。

一方、マイコトキシンについて、オクラトキシンはグリセリン-エタノール混液 (1:1) を噴霧することにより 2 倍に、アフラトキシン B₁ は流動パラフィン-*n*-ヘキサン (2:1) で 2.5 倍に増けい光することが判明した。

今後、同様な効果が種々のけい光物質についても期待できるので、簡易微量分析法である TLC-けい光濃度法の有力な増けい光法として本法は実用価値があると考えられる。

4 結 言

TLC-けい光濃度法において、展開後のプレートに流動パラフィンなどの揮散性がなく粘度の高い有機溶媒を均一噴霧装置を用い噴霧することによって DNS-アミンのスポットを増けい光させ、定量限界を 10 倍下げることができた。更に本法はプレート上のベンゾ(a)ピレンのけい光強度を 35 倍も高めるなど他のけい光物質にも有効であり、TLC-けい光濃度法の増けい光法として実用できることが判明した。

(1975 年 10 月, 日本食品衛生学会第 30 回学術講演会において一部発表)

文 献

- 1) 内山貞夫, 野津喜代子, 林田尚子, 近藤龍雄, 田辺弘也: 食衛誌, **13**, 115 (1972).
- 2) U. Hezel: *Angew. Chem. internat. Edit.*, **12**, 298 (1973).
- 3) 内山貞夫, 近藤龍雄, 内山 充: 食衛誌, **17**, 345 (1976).
- 4) H. L. Trenk, F. S. Chu: *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **54**, 1307 (1971).
- 5) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 内山 充, 直井家寿太, 中尾美津男: 食衛誌, **17**, 193 (1976).
- 6) E. Stahl: "*Thin-Layer Chromatography*", 2nd Ed., p. 79 (1969). (Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York).

☆

Fluorescence enhancement in thin layer chromatography-fluorodensitometry using viscous organic solvents. Sadao UCHIYAMA, Tatsuo KONDO and Mitsuru UCHIYAMA (National Institute of Hygienic Science, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

The uniform spraying of non-volatile and viscous organic solvents such as liquid paraffin or glycerol on a thin layer plate after development resulted in a considerable increase in fluorescence intensity and stability

of some fluorescent spots. From the above facts, a new fluorescence-enhancing method on a plate was applied to thin layer chromatography (TLC)-fluorodensitometry. A new spray equipment, which possessed a sprayer with a gas pressure regulator, a belt conveyer to carry a plate and a spray cabinet with a ventilation flue, was made out. It made possible to spray a reagent uniformly at the position of the same R_f value. Thus, the fluorescence intensity of the spot at the same R_f could be enhanced in the same ratio. The detection limits of volatile amines such as dimethylamine were lowered to 1/10 by increasing the fluorescence intensities of the spots of 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonamides with a mixture of liquid paraffin and *n*-hexane (2 : 1) (each limit of detection : 1×10^{-5} M as

a test solution). The fluorescence intensity of benzo(a)-pyrene increased thirty five times by the same condition. This method was also useful for some mycotoxins.

(Received May 27, 1977)

Keywords

Benzo(a)pyrene

5-(Dimethylamino)-1-naphthalenesulfonamide

Fluorescence enhancement

Liquid paraffin

Spraying procedure

Thin layer chromatography-fluorodensitometry

高分子水溶液における $^1\text{H-NMR}$ 化学シフトの基準 についての研究

小野 祥子, 三森 文行, 荒田 洋治, 藤原 鎮男*

(1977年6月11日受理)

水溶液系の $^1\text{H-NMR}$ においては、内部標準として、(3-trimethylsilyl)-propane sulfonic acid sodium salt (DSS) が、広く用いられているが、基準にとる DSS のシグナル自身が、ある種のたん白質溶液では高磁場にシフトすることが、当研究室において明らかにされた。これは、化学シフトの測定上、重要な知見であり、検討を要すると思われる。よって、本研究では、高分子水溶液系における化学シフトの基準について、主としてたん白質の重水溶液を用い、内部標準法及び外部標準法にわたり、詳細な実験を行った。この結果、内部標準としては、重水溶液の場合、その中の HDO、外部標準としては、重水又は水に溶かした DSS が適当であることが分かった。ただし、HDO を使用する場合には、温度を一定にすることに注意しなければならない。

1 目 的

従来、水溶液系の $^1\text{H-NMR}$ において、内部標準として、DSS のメチル基のシグナルが、広く使われているが、DSS の共鳴点が、たん白質の共存により、高磁場シフトすることが、当研究室において明らかにされた。又、内部基準として用いた DSS、あるいは、2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium salt (TSP) が、プリン系塩基の共存により、高磁場シフトすることが既に報告されている¹⁾。これらの事実は、水溶液の化学シフトを測定するうえで、誤差の原

因となるものであり、水溶液試料における化学シフト測定によりよい標準を確立することが必要となった。本研究では、この目的を達するため、主として高分子水溶液試料を対象として、内部標準法、外部標準法にわたった実験を行った。

2 実 験

2.1 装 置

NMR の測定には、JEOL PS-100 分光計を使用した。各点について、少なくとも3回の測定を行い、その平均値を用いた。

* 東京大学理学部化学教室：東京都文京区本郷 7-3-1