

## ノ ー ト

混合溶媒中での 2, 2'-ジヒドロキシ-  
4, 4'-ジメチルアゾベンゼンによるガ  
リウムの蛍光定量

渡 辺 邦 洋\*

(1983 年 5 月 26 日受理)

## 1 緒 言

2, 2'-ジヒドロキシアゾベンゼン (DHAB) はマグネシウム<sup>1)</sup>, アルミニウム<sup>2)</sup>, ガリウム<sup>3)</sup>, チタン<sup>4)</sup>などの蛍光又は吸光定量試薬としてよく知られている。この DHAB にメチル基を導入した 2, 2'-ジヒドロキシ-4, 4'-ジメチルアゾベンゼン (4, 4'-DDAB) は Freeman ら<sup>5)</sup>により DHAB に比較し、より高感度な蛍光試薬となりうることを示唆されている。しかしこの 4, 4'-DDAB を利用した詳細な定量法の検討はなされていない。著者はこの 4, 4'-DDAB により生成したガリウム錯体がエチレンジアミン (en) 共存で著しく蛍光強度を増大させ、更にこの発蛍光性錯体は混合溶媒中で pH 10.7~11.8 という高い pH 領域で生成し、多数知られるガリウム錯体の生成条件<sup>6)</sup>とは異なっていることを見いだした。又溶媒の蛍光強度に及ぼす影響は大きく、ジオキサン溶媒中で最大の蛍光を発する。これらのことから本法は興味あるガリウム定量法になりうると期待される。そこでジオキサンを含む混合溶媒中での 4, 4'-DDAB によるガリウム定量法を詳細に検討した

## 2 実 験

## 2.1 試 薬

ガリウム標準溶液：ガリウム (99.99%) 0.1098 g を王水で溶解し、蒸発乾固した後、塩酸 (1+1) で再溶解し、希釈して使用した。

4, 4'-DDAB 溶液：Freeman ら<sup>7)</sup>の方法により合成したものをジオキサンの溶解して使用した。m. p. (224~225) °C {文献値 (223~224) °C}, 元素分析値 (%) H : 5.89, N : 11.56, C : 69.40 (計算値 H : 5.82, N : 11.56, C : 69.41)。

en : 特級 en をそのまま使用した。

緩衝液：en 100 ml に塩酸 2.5 ml を加え、エタノールで 500 ml とした。

ローダミン B 溶液：和光純薬製特級ローダミン B をエタノールで溶解、蒸留水で希釈し、0.10 µg/ml (エタノール：水=2:3) とその 10 分の 1 の溶液を調製した。

ジオキサン：特級 1,4-ジオキサンをそのまま使用した。

その他の試薬及び溶媒：市販特級品をそのまま使用した。

## 2.2 装 置

蛍光測定は日立 204 型 (キセノンランプ使用) 分光蛍光光度計を使用した。誘電率測定には安藤電気 (株) 製 TR-IC 型広帯域誘電体損測定器を使用した。又 pH 測定は東亜電波製 HM-5A 型 pH メーターを使用した。

## 2.3 基本操作

ガリウム 0~5 µg を含む試料溶液 (1~9) ml に緩衝液 (エタノール溶液) 5 ml を加え、これにジオキサン 35 ml と 0.006 % 4, 4'-DDAB ( $2.47 \times 10^{-7}$  mol/ml) 1 ml を添加し、蒸留水で正しく 50 ml とする。ローダミン B 溶液を標準として比蛍光強度を測定する。

## 3 結果及び考察

## 3.1 励起及び蛍光スペクトル

基本操作に従って測定したガリウム錯体の励起及び蛍光スペクトルはそれぞれ 490 nm, 565 nm に極大が見られた。キセノンランプの励起光強度分布及び光電子増倍管の感度特性について補正したスペクトルはそれぞれ 505 nm, 588 nm で極大を示したが以後の実験は見掛けの極大波長で測定を行った

## 3.2 溶媒の影響

共存する有機溶媒の影響を見るために基本操作のジオキサン、エタノールを他の溶媒に代えて、(5~40) ml の範囲で含有量を変化させた。結果を Fig. 1 に示す。水溶液中ではほとんど蛍光を発しないが有機溶媒の含有率が 50 % 以上で蛍光強度は増大し、純粋な有機溶媒中で最大に達するものと思われる。特にジオキサンは用いた溶媒の中では増感効果が著しく、最も有効な溶媒であった。しかしジオキサンが高濃度では溶液が不均一になりやすいためエタノールの添加を必要とする。そこでジオキサンとエタノールの最適混合比を得るために、それらの全量を 40 ml とし、混合比を変化させた結果を Fig. 2 に示す。蛍光強度はジオキサン含有率の増大とともに増加しており、可能な限りジオキサン含有率の高いほうが望ましい。このジオキサンの効果は単なる溶媒和より

\* 東京理科大学理工学部工業化学科：千葉県野田市山崎東亀山 2641

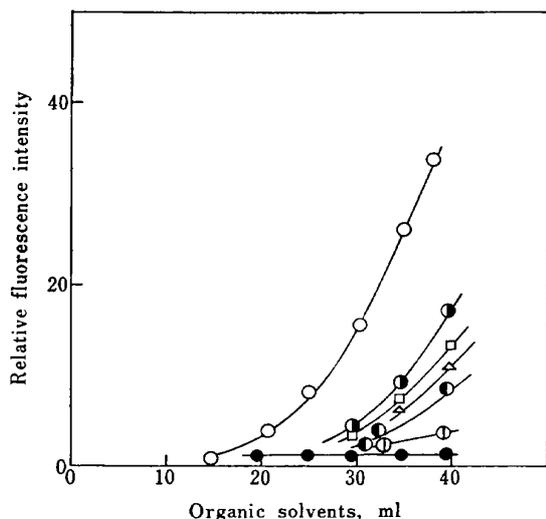


Fig. 1 Effect of amount of organic solvents on relative fluorescence intensity

○ : Dioxane, ● : Methyl cellosolve, □ : Pyridine, △ : Ethanol, ● : Methanol, ○ : Acetone; Ga : 3.3  $\mu\text{g}$ , en :  $1.5 \times 10^{-2}$  mol, 4,4'-DDAB :  $2.47 \times 10^{-7}$  mol, Total volume : 50 ml, ● : Dioxane (reagent blank)

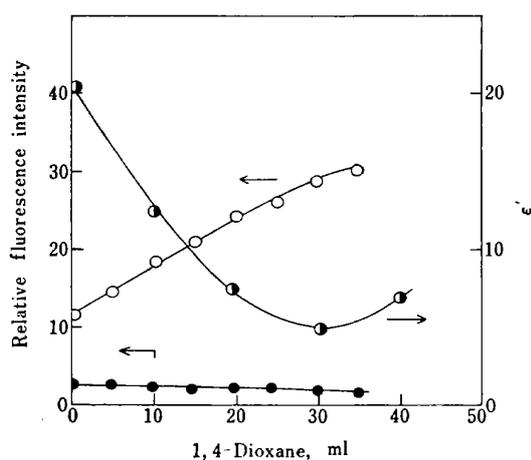


Fig. 2 Effect of mixtures of ethanol and dioxane on relative fluorescence intensity and on dielectric constant

Ethanol + dioxane = 40 ml, The others obey standard conditions. ● : Reagent blank

ガリウム-4,4'-DDAB-en 錯体の有する配位水分子のジオキサンによる置換の効果と推定される。一方ジオキサンは他の溶媒より著しく低い誘電率 ( $\epsilon' = 2.2$ ) を示すことから混合溶媒の誘電率の効果も考えられ、これと蛍光強度の相関を見た。その結果 Fig. 2 に示すようにそれらの相関は得られず、溶媒の増感効果は少なくともバルクの溶媒の誘電率とは無関係であった。

実験では en を含むエタノール 5 ml, ジオキサン 35 ml を添加することにした。

### 3.3 錯体生成 pH

一般にガリウム錯体の生成 pH 範囲<sup>9)</sup>はガリウムイオンの溶存状態から弱酸性領域が大部分である。しかし 4,4'-DDAB によるガリウム蛍光性錯体は Fig. 3 に示すように pH 10.7~11.8 の範囲で定量的に生成し、他に例を見ない高 pH 領域での生成である。これは 4,4'-DDAB の酸解離定数  $pK_{a1}$  が実験条件下では 12.0 と大きいこと、更に en によるガリウムの加水分解の抑制などに起因している。又試薬空試験値が pH 10 付近で増大しているのは pH 調整に使用する塩酸中の不純物によるものも一部あるが en, 4,4'-DDAB が関与する蛍光性物質生成の結果と思われる。なお溶液の pH は pH メーターの読みをもって pH とし、有機溶媒共存による補正は行っていない。

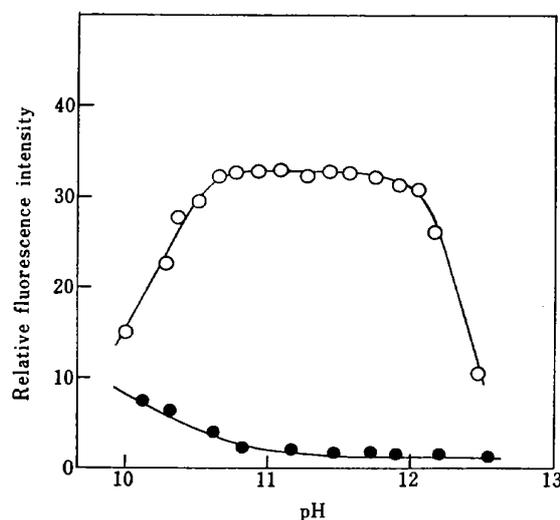


Fig. 3 Effect of pH on fluorescence intensity

Ga : 3.3  $\mu\text{g}$ , Buffer solution : 5 ml, 4,4'-DDAB :  $2.47 \times 10^{-7}$  mol, Dioxane : 35 ml, ● : Reagent blank, Total volume : 50 ml

### 3.4 4,4'-DDAB 量の影響

ガリウムに対する 4,4'-DDAB の必要量をモル比法により調べた。金属 ( $3.3 \mu\text{g}$ ,  $4.7 \times 10^{-8}$  mol) に対して (3~6) 倍の添加によりほぼ一定値を示し、大過剰の添加により蛍光強度は減少した。モル比法ではガリウムに対する 4,4'-DDAB の組成比は明らかにならなかったが連続変化法による結果は明確な 1:1 の組成比であった。

### 3.5 エチレンジアミン量の影響

緩衝液として en, アンモニア水, 炭酸ナトリウム, ホウ酸ナトリウム, リン酸ナトリウムを用いて溶液を調製し、その有効性を検討した。その結果、蛍光を示した

のは en とアンモニアのみであり、アンモニアは en に比べ、蛍光強度は微弱であった。このことから en は pH 調整の役割と配位子としての作用も有し、錯体形成上重要な一成分であることが予想される。そこで平衡移動法により、ガリウムと en の組成比を調べた結果 1 : 1 であった。又最大蛍光強度を示す en の必要量は  $4.7 \times 10^{-3}$  mol のガリウムに対し 0.5 ml ( $7.7 \times 10^{-3}$  mol) 以上であった。しかし 0.5 ml では緩衝能が弱く、1.5 ml 以上では塩酸との沈殿が生成することから実験では 1 ml を使用することにした。実際には緩衝液をエタノール : en : 塩酸 = 4 : 1 : 0.025 とし、前述したエタノール 5 ml に代えて、これを 5 ml 加えることにした。

### 3.6 検量線

検量線はローダミン B 溶液 (0.10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 50 目盛にセットするときガリウム (0.5~5)  $\mu\text{g}$  の範囲で良好な直線性を示し、10  $\mu\text{g}$  までは定量可能であった。又更に希薄なローダミン B 溶液 (0.010  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を使用するとき (0.04~0.5)  $\mu\text{g}$  の範囲で定量が可能となり、検出限界は 0.015  $\mu\text{g}$  であった。

一方この錯体のモル吸光係数は  $1.7 \times 10^4$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (490 nm),  $2.15 \times 10^4$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (505 nm) であった。

### 3.7 共存元素の影響

ガリウムと共存時に正の妨害をする金属イオンとしてアルミニウム、マグネシウム、インジウムがあり、負の妨害をするものにコバルト、クロム、銅、鉄、マンガ、チタン、バナジウム、ハフニウム、ジルコニウムがある。これら妨害元素の分離、マスキングには種々の方法が可能であり、本法の特徴である高 pH 領域での反応という点から、マスキング剤にシアン化カリウムも使用できる。しかしガリウムを特異的に分離できることから、従来から利用されている 7 M 塩酸溶液からのメチルイソブチルケトン又はエーテルによる抽出分離が最適である<sup>8)</sup>。又陰イオンについては塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、チオシアン酸イオン、酢酸イオンなどは妨害しないがチオグリコール酸及びその他のガリウムと錯形成する有機試薬は妨害する。

## 4 結 語

ジオキサン、エタノール、水から成る混合溶媒中での 4,4'-DDAB によるガリウム定量法を明らかにした。本法は高い pH 領域で錯体を生成させ、(0.04~10)  $\mu\text{g}$  の範囲でガリウムの定量が可能であった。生成した錯体は

pH 調整に用いられる en も配位子として含み、en はジオキサンと同様に蛍光強度増大に大きく寄与している。

終わりにご指導いただいた川垣恭三教授、実験についてご協力いただいた坂本則明氏、椿 信之氏に感謝致します。

(1982年9月,日本分析化学会)  
(第31年会において一部発表)

## 文 献

- 1) H. Diehl, R. Olsen, G. I. Spielholtz, R. Jensen : *Anal. Chem.*, **35**, 1144 (1963).
- 2) 渡辺邦洋, 吉沢英幸, 川垣恭三 : 分化, **30**, 640 (1981).
- 3) J. R. Kirby, R. M. Milburn, J. H. Saylor : *Anal. Chim. Acta*, **26**, 458 (1962).
- 4) 渡辺邦洋, 宮川夏実, 川垣恭三 : 分化, **31**, 632 (1982).
- 5) D. C. Freeman, Jr., C. E. White : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2678 (1956).
- 6) F. D. Snell : "Photometric and Fluorometric Methods of Analysis", p. 497 (1978), (John Wiley & Sons, Inc., New York).
- 7) D. C. Freeman, Jr., C. E. White : *J. Org. Chem.*, **21**, 379 (1956).
- 8) E. B. Sandell : "Colorimetric Determination of Traces of Metals", 3rd Ed., p. 471 (1959), (John Wiley & Sons, Inc., New York).

☆

**Fluorometric determination of gallium with 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethylazobenzene in mixed solvent.** Kunihiro WATANABE (Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641, Higashi-Kameyama, Yamazaki, Noda-shi, Chiba)

Fluorometric determination of gallium with 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethylazobenzene (4,4'-DDAB) has been investigated. Gallium reacts quantitatively with 4,4'-DDAB in the presence of ethylenediamine(en) to form a ternary complex. The optimum pH range for the formation of the ternary complex, which has a red fluorescence with an emission maximum at 588 nm, was 10.7~11.8. The composition of the ternary complex was Ga : 4,4'-DDAB : en = 1 : 1 : 1. As dioxane content in the solvent mixture of dioxane, ethanol, and water increased, the fluorescence intensity of the complex increased remarkably. The recommended procedure is as follows : Take (1~9) ml of a sample solution containing less than 10  $\mu\text{g}$  of gallium, and add 5 ml of a buffer solution (ethanol : en : HCl = 4 : 1 : 0.025), 35 ml of dioxane, and 1 ml of a 0.006 % 4,4'-DDAB solution. Dilute the mixture to 50 ml with water. Measure the relative fluorescence intensity of the mixture at 588 nm with excitation wavelength of 505 nm. Using 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rhodamine B solution as a setting reagent, (0.04~10)  $\mu\text{g}$  of gallium was determined.

(Received May 26, 1983)

**Keyword phrases**

fluorometric determination of gallium; 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethylazobenzene; effect of addition of ethylenediamine; effect of dioxane.

## ガスクロマトグラフィーによるマンノサミンの同定法

小島 寛<sup>®</sup>, 岡平 明, 丹羽誠一\*

(1983年5月26日受理)

### 1 緒 言

マンノサミンは、最近特に細菌中の微量構成成分として存在が注目されつつある<sup>1)~3)</sup>が、その存在が微量で、かつ他のヘキソサミンと混在していることが多いため、同定が困難であった。

筆者らは、正確かつ簡便なマンノサミン微量同定法の開発を目指して研究を続けてきたが、ヘキソサミンをメチルグリコシドアセタート (以下 MA と略記) 誘導体として、定温ガスクロマトグラフ (以下 GC と略記) 法により分析する簡便な微量同定法を確立したので報告する。

### 2 実験材料及び方法

#### 2.1 GC 分析装置

水素炎イオン化検出器 (FID) を備えた島津 GC-4CM 型 GC 装置を使用し、島津クロマトパック R1A に連結して保持時間を測定した。

#### 2.2 GC 分析条件

次の3種の定温分析条件により測定した。

(i) 10% シリコンガム SE-30/クロモソルブ W-AW {(80~100) メッシュ}, 2m×3mm ガラスカラム, キャリヤーガス:窒素 60 ml/min, カラム温度:210 °C, 試料気化室及び検出部温度:250 °C.

(ii) Tabsorb<sup>®</sup> (Regis Chemical Co. 製), 1m×3mm ガラスカラム, キャリヤーガス:窒素 60 ml/min, カラム温度:210 °C, 試料気化室及び検出部温度:250 °C.

(iii) 3% Silar-10C/クロモソルブ W-NAW {(80~100) メッシュ}, 1m×3mm ガラスカラム, キャリヤーガス:窒素 80 ml/min, カラム温度:220 °C, 試料気化室及び検出部温度:250 °C.

#### 2.3 標準メチルヘキソサミニドパーアセタート類

グルコサミン, ガラクトサミン及びマンノサミンのグリコシド類は、それぞれ市販の *N*-アセチル化物 (半井化学薬品製) から、小島ら<sup>4)</sup>の方法により調製した。これらの融点, 旋光度を Table 1 に示した。得られたグリコシド類を, ピリジン・無水酢酸を用いて常法により

Table 1 Melting points and specific rotations of methyl *N*-acetyl-hexosaminides

Hexosaminide derivative	Melting point (°C)	Specific rotation ( $c=1.0$ , in H <sub>2</sub> O)	
Me GlcNAc $\alpha$ -pyr	188.5~189.5	+135.9 <sup>0</sup>	
	$\beta$ -pyr	204.0~204.5	-46.0 <sup>0</sup>
	$\alpha$ -fur	140.0~140.5	+117.4 <sup>0</sup>
	$\beta$ -fur	Syrup	-56.2 <sup>0</sup>
Me GalNAc $\alpha$ -pyr	217.0~218.0	+193.5 <sup>0</sup>	
	$\beta$ -pyr	234.0~234.5	+8.3 <sup>0</sup>
	$\alpha$ -fur	Syrup	+107.3 <sup>0</sup>
Me ManNAc $\alpha$ -pyr	171.0~171.5	-77.8 <sup>0</sup>	
	$\beta$ -pyr	135.0~136.5	-76.3 <sup>0</sup>
	$\alpha$ -fur	177.0~178.0	+139.2 <sup>0</sup>
$\beta$ -fur	133.0~134.0	-57.6 <sup>0</sup>	

Abbreviations: Me GlcNAc=methyl *N*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucosaminide, Me GalNAc=methyl *N*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-galactosaminide, Me ManNAc=methyl *N*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-mannosaminide, pyr=pyranoside, fur=furanoside

Table 2 Relative retention times of methyl hexosaminide peracetates

Peracetate of	Relative retention time			
	Tabsorb <sup>®</sup>	Silar-10C	SE-30	
Me GlcN $\alpha$ -pyr	1.10	1.63	1.14	
	$\beta$ -pyr	2.62	5.58	1.27
	$\alpha$ -fur	1.24	1.75	1.23
	$\beta$ -fur	3.37	6.09	1.44
Me GalN $\alpha$ -pyr	1.07	1.64	1.12	
	$\beta$ -pyr	2.93	6.29	1.28
	$\alpha$ -fur	1.02	1.36	1.08
Me ManN $\alpha$ -pyr	1.72	3.30	1.13	
	$\beta$ -pyr	1.45	2.98	1.16
	$\beta$ -pyr	1.45	2.74	1.10
$\alpha$ -fur	1.94	4.34	1.19	
$\beta$ -fur	1.22	2.11	1.15	
<i>m</i> yo-Inositol (I. S.)	1(4.50 min)	1(6.73 min)	1(14.54 min)	

Column conditions—Tabsorb<sup>®</sup>: Column temperature 210 °C, Carrier gas N<sub>2</sub>, 60 ml/min; Silar-10C: Column temperature 220 °C, Carrier gas N<sub>2</sub>, 80 ml/min; SE-30: Column temperature 210 °C, Carrier gas N<sub>2</sub>, 60 ml/min; Abbreviations: Me GlcN=methyl D-glucosaminide, Me GalN=methyl D-galactosaminide, Me ManN=methyl D-mannosaminide, pyr=pyranoside, fur=furanoside

\* ゼリア新薬工業(株)医化学総合研究所:京都市山科区御陵別所町 95