

薄層スポットの拡散反射赤外スペクトル

——脂肪族アルデヒド分析への応用——

小 泉 均*
鈴 木 義 仁*

(昭和61年9月1日受理)

Diffuse Reflectance Infrared Spectrometry on the Thin-Layer Chromatographic Spots

——Application to determination of trace
amounts of aliphatic aldehyde——

by Hitoshi KOIZUMI* and Yoshihito SUZUKI*

Abstract

This paper presents a method for the determination of trace amounts of aliphatic aldehydes on thin-layer chromatographic (TLC) plates by diffuse reflectance Fourier transform infrared (DRIFT) spectrometry. 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) was used as a reagent for preparing derivatives of aldehydes and the DNP-hydrazones which were formed could be separated by TLC. After derivatives had been developed with benzene-hexane (2:1) solvent system on silicagel plates, qualitative analyses were done by R_f values. Again they were developed with benzene-ethyl acetate (1:5) solvent system for concentrating the spread spots at the solvent front. Concentrated spots were scratched off the plate and mixed with potassium bromide powder. DRIFT was used for measuring the infrared spectra of sample powder. All DRIFT spectra were shown in Kubelka-Munk format by using the FTIR data system. Calibration curve of aliphatic aldehyde was linear in the concentration between 4.3 ppm and 42 ppm.

1. 諸 言

クロマトグラフィーによって分離した成分のそれぞれを高い信頼性で定性分析するためにはクロマトグラフィーによる保持値のみでは不十分であり、このため分離した成分のスペクトル分析、例えば質量分析、フーリエ変換赤外分光法、共鳴ラマン法等のスペクトル分析と組み合わせる必要がある。赤外 (IR) スペクトルは有機化合物について多くの振動モードに対応した振動スペクトルを示すため強力な同定手段であり、特にフーリエ変換赤外分光計 (FTIR) は従来の分散型の赤外分光計と比べて高感度、高精度で、データ処理能力も高いため微量成分についての測定が比較的容易に行える。このため、種々の分離法と FTIR を組合わせて同定する方法が提案されている。各種のインターフェ

イスを用いてガスクロマトグラフィー¹⁾や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)²⁾と直結して各ピークを同定するためのスペクトル測定がなされている。

一方薄層クロマトグラフィー (TLC) との併用についても多くの研究がある^{3)~6)}。この場合には主として TLC を行った後、分離されたスポットを削り取り、適当な溶媒で薄層スポットから分離された成分を抽出し、KBr 錠剤法や溶液法によりスペクトル測定が行われている。

最近になって、KBr の微粉末上に付着させ拡散反射スペクトル測定を行う方法が開発された。この拡散反射法は従来の透過法によるスペクトル法と比べて検出感度が高く、試料の付着量が少ない場合にはかなり深い試料層からのスペクトルも測定可能である。このため微量の成分についての有効なスペクトル測定となってきた。また、拡散光を用いるため、TLC の薄層スポットのスペクトルを直接測定することも可能である。

* 工学基礎教室, Department of Basic Engineering

Griffithsらは拡散反射フーリエ変換赤外分光法 (DRIFT) により粉体試料やシリカゲルに吸着した微量の有機化合物のスペクトル測定を行い^{4),5)}, Zuberらはシリカゲル, アルミナ, セルロース等の薄層を用いてTLCを行い, 薄層スポットを直接DRIFT測定する方法を検討している⁶⁾。しかし詳細な定量的取扱いは行っていない。

本報ではDRIFT法を用いて, TLC板上の薄層スポットとして付着している微量成分の定量的な検討を行った。まず溶液中に微量に存在するカルボニル化合物を対象として, このものの濃縮操作とTLCの分離条件を明らかにした。また, TLCの薄層スポットに付着している有機化合物を濃縮してDRIFT法に適用できるようにするための薄層スポット先端濃縮法を考案した。濃縮したスポットを高感度に検出するためにDRIFT法の最適条件の検討も行った。この先端濃縮法はTLCとの併用で赤外スペクトル測定を行う方法やZuberのTLC板上でのDRIFT法に比べて, TLC分離後再びプレート上で試料を濃縮するためDRIFT法との併用がより効果的となり微量成分への適用に利点があることが判明した。本法による定量性について検討した結果, 溶液中に存在する脂肪族アルデヒドの4 ppm濃度においてTLCと本法のDRIFT法によるIRスペクトルからの定量分析が可能であり, また得られたIRスペクトルから定性分析も行えるためTLCと組み合わせることにより有用な分析法であることが判明した。

2. 実 験

2.1 試料・試薬および装置

試料・試薬: アセトアルデヒド (C2), ブチルアルデヒド (C4), カブロンアルデヒド (C6) おおの 1×10^{-2} mol/l 含むエタノール溶液を調製し, これを原液として適宜水で希釈して定量的な取扱いを行う場合の試料として用いた。アルデヒドを誘導体に変換するため2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 試薬溶液は濃度5 mg/ml エタノール溶液を用いた。また, TLC分離条件を検討するために必要なC1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C10の直鎖脂肪族アルデヒドの2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (2,4-DNPヒドラゾン) を別途合成した。薄層用吸着剤にはワコーゲルB-5 (粒子径 46 μm 以下のものを75%以上含む。和光純薬) を用いた。展開などに用いた溶媒は全て市販特級品である。KBr (日本分光 赤外用) はメノウ乳鉢で粉碎後, 325メッシュのふるいを通過した粒子径44 μm 以下の粉末を拡散反射測定の希釈剤として用いた。

装置: 薄層板の作製にはアプリケーション (東洋科学産業) を用いた。DRIFT測定はDIGILAB FTS-20C/D型フーリエ変換赤外分光光度計 (TGS検出器付) およびJASCO インターナショナル社製拡散反射装置を用いた。

2.2 アルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの誘導体化

所定濃度のアルデヒド溶液100 mlに5 mlの2,4-DNPH溶液を加え, 70°Cで10分間反応させた。冷却後, 反応液は50 mlのベンゼン-ヘキサン混合溶媒 (1:1) で抽出した。有機層を減圧下で乾固した後, 残渣をベンゼンに溶解させ, 10 mlのメスフラスコ中で定体積とした。

2.3 薄層板の作製と展開操作

30 gのワコーゲルB-5を水50 mlで乳鉢内で混合し, 20×20 cmの平面ガラス板上に0.25 mmの厚さにアプリケーションを用いて塗布した。10分放置後, 110°Cで30分活性化した後デシケーター中に保存した。

2.2で調製した2,4-DNPヒドラゾン溶液100 μl をマイクロシリンジで量りとり, 薄層板の下端より2 cmの位置に数回に分けて広がらないように付着した。展開は縦形槽中でサンドイッチ法で行った。まずベンゼン-ヘキサン (2:1, V/V) の混合溶媒を用いて10 cm展開を行い, 試料成分の R_f 値による定性分析を行った。次いで分離された2,4-DNPヒドラゾンは広がっているためこれらのスポットを濃縮するため薄層板を90°回転させて第二回目の展開を行うか, または同一方向で第二回目の展開を行う。この場合にはいずれも溶出力の強いベンゼン-酢酸エチル (1:5) を展開溶媒として用いる。この第二回目の操作で各薄層スポットは溶媒の上昇とともに移動を始め, 薄層スポットを溶媒が通過すると帯状となって溶媒先端に濃縮される。展開終了後, 薄層板を風乾し, この濃縮部分をDRIFTの試料とした。

2.4 拡散反射スペクトルの測定

シリカゲルに帯状に濃縮した2,4-DNPヒドラゾンを削りとりKBr粉末と混合した。この混合試料をステンレス製試料皿に移し入れ表面を平らにした後, 拡散反射装置の試料台上に水平に置いて測定した。また対照としてはTLC板上の試料の存在しない溶媒先端部を削り取りKBr粉末と混合したものを用いた。

分解能8 cm^{-1} , 積算回数512回の条件で試料および対照物の反射光をそれぞれ測定した後, 内蔵されているコンピューター (Data General NOVA3) により下記のKubelka-Munk関数処理⁷⁾を行いスペクトルを得た。

$$f(r_{\infty}) = (1 - r_{\infty})^2 / 2r_{\infty} = c/k', k' = s/2.303\epsilon$$

ここで r_{∞} : 相対拡散反射率, c : モル濃度, s : 有効散乱係数, ϵ : モル吸光係数である。

3. 結果および考察

3.1 2,4-DNP ヒドラゾンの相互分離と濃縮

直鎖脂肪酸アルデヒドの2,4-DNP ヒドラゾンのTLC分離例は数多く報告されている^{8),9)}。本法ではシリカゲル(ワコーゲルB-5)と三種類の展開溶媒系の組合わせを用いて2,4-DNP ヒドラゾンの相互分離を行った。得られた R_f 値を **Table 1** に示す。

ベンゼン-ヘキサン (S1) およびベンゼン-石油エーテル (S2) の溶媒組成系はほぼ同様な分離を示した。酢酸エチルを展開溶媒に用いると全般に R_f 値は大きくなりかつ炭素数間の R_f 値の差は小さくなり分離能は低下した。

展開操作によって各成分は薄層板上で拡散したスポットとなるためこれを直接 DRIFT 法で高感度に検出することは困難であり、定量的な取り扱いは一層不利と考えられる。そこで拡散したスポットを濃縮する方法として酢酸エチルを加えた展開溶媒を用いて第二回目の展開操作を行う必要があると判断した。Table 1 のようにベンゼン-酢酸エチル (S4) では各誘導体は溶媒先端に濃縮できることがわかった。

そこで S1 の溶媒組成で展開後、得られた R_f 値から試料成分についての推定を行った後再び S4 の溶媒組成で第一回目の展開方向に対して 90° の方向または薄層板下端により約 5 cm 展開すると一回目の展開で広

Table 1 R_f value of 2,4-dinitrophenylhydrazones of alkanals on thin layer chromatography

2,4-DNP hydrazone of	solvent	$R_f \times 100$			
		S1	S2	S3	S4
Methanal		17	32	54	98
Ethanal		18	31	54	98
Propanal		25	40	57	100
Butanal		28	43	58	100
Pentanal		32	47	60	100
Hexanal		36	50	62	100
Heptanal		38	55	64	100
Decanal		43	61	70	100

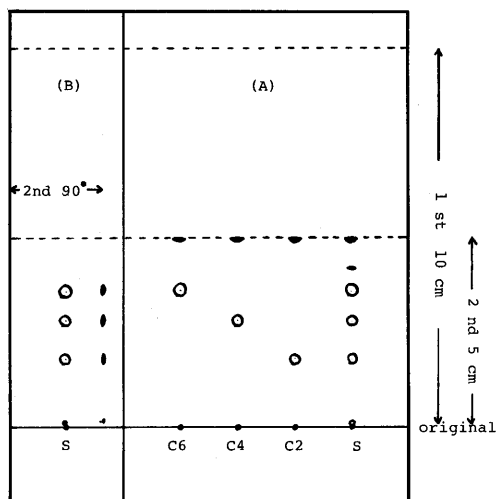
Layer: Wako Gel B-5 (0.25 mm thickness)

Solvent: S1 benzene-hexane (2:1)

S2 benzene-petroleum ether b.p. 30-70°C (3:1)

S3 benzene-ethyl acetate (20:1)

S4 benzene-ethyl acetate (1:5)



2nd development

(A) : same direction as 1st

(B) : 90° rotation against 1st

The first development solvent : benzene-hexane (2:1)

The second development solvent : benzene-ethyl acetate (1:5)

S : mixture of 2, 4-DNP hydrazone and reagent

Cx : carbon number of aldehyde

Fig. 1 Separation and concentration of 2,4-dinitrophenyl hydrazones on silica gel plate.

がった薄層スポットは再び第二回目の展開によって溶媒先端に帯状に濃縮される。また、同一方向へ展開した場合でも過剰の2,4-DNPHの R_f 値は0.85であり、定量の妨害とはならない。得られたクロマトグラムを **Fig. 1** に示す。

3.2 DRIFT 法による赤外スペクトル

実験に用いた拡散反射装置は試料台上で試料に照射される赤外光束は $8\text{ mm}\phi$ であった。そこでこの装置を使用して Griffiths らの方法に従って赤外スペクトルを測定した。すなわち C2, C4, C6-2,4-DNP ヒドラゾン混合物 ($63\text{ }\mu\text{g}$) を KBr 粉末と混ぜてスペクトルを測定した。Fig. 2 に得られたスペクトルを示す。このように $63\text{ }\mu\text{g}$ 程度の微量の試料で良好なスペクトルを得ることができた。

3.3 赤外希釈剤 (KBr) と検出感度

DRIFT 法では赤外不活性な KBr と混合した後拡散反射測定を行う。この KBr 粉末の添加によって試料は希釈分散するため、希釈剤 KBr の添加量による検出感度を検討しておく必要がある。一定量の試料 ($105\text{ }\mu\text{g}$ の C2, C4, C6-2,4-DNP ヒドラゾン混合物) を 2.

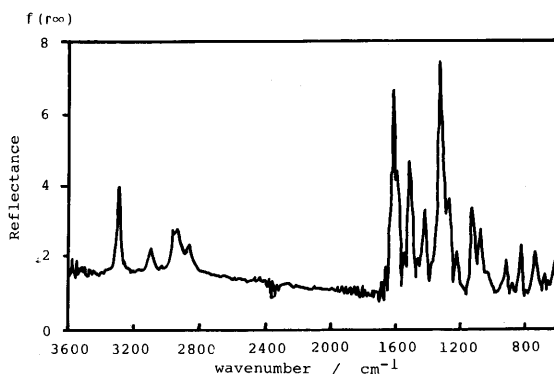


Fig. 2 Kubelka-Munk diffuse reflectance spectrum of 2,4-dinitrophenylhydrazine mixture (C2, C4, C6, 63 μ g) in KBr vs KBr reference.

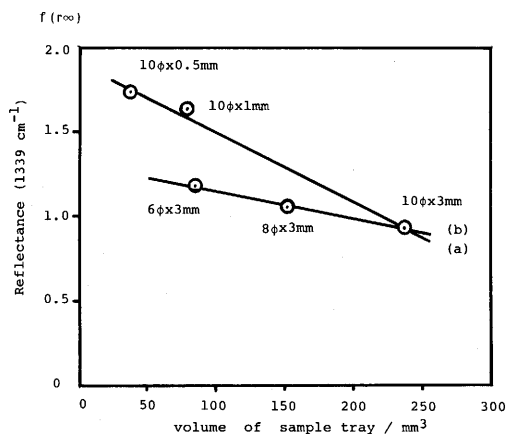


Fig. 3 Effect of sample tray volume (inside diameter and depth) on detection.

3で述べた方法により薄層板上のシリカゲルに濃縮した後、濃縮部分を削り取り、試料皿の容積（直径10φが一定で深さの異なる）に見合うKBr量と十分混合して試料粉末とした。削り取ったシリカゲルはいずれも6mg程度であった。DRIFT法で赤外スペクトルを測定し、誘導体の1339 cm^{-1} のニトロ基の吸収バンド強度を求めた。その結果はFig. 3(a)のようにKBrの希釈量によって赤外スペクトルの強度は減衰することが判明した。

3.4 試料層の厚さ

次に拡散反射法では試料皿の表面積と試料層の厚さとがスペクトル感度に関与する。そこで6mmφ×3mm, 8mmφ×3mm, 10mmφ×3mm, 10mmφ×1mm, および10mmφ×0.5mmなど各種の試料皿を用

いてDRIFT測定を行った。その結果をFig. 3(b)に示した。

Fig. 3の結果から、希釈剤(KBr)の量が少ない皿を用いる程、また同一径の皿の場合には試料層の浅い皿を用いる程検出感度が高くなることがわかった。この理由としてシリカゲルによる反射光の影響が強いため、赤外光は試料層の表面部分にのみに限られているためと考えられる。したがって希釈剤の添加量をなるべく少なくして試料の濃度を高めて測定することが良好なスペクトルや検出に有利であることが判明した。以上のことから直径10mm, 深さ0.5mmの試料皿(必要とするKBr量は30mg)を用いてDRIFT測定を行うこととした。

シリカゲルによる赤外吸収帯は3600~3200 cm^{-1} にSi-OH吸収帯, 1300 cm^{-1} 以下にはSi-O吸収帯が強い。したがってシリカゲルが存在する場合の測定可能な赤外スペクトルの領域はFig. 2の図中で3200~1300 cm^{-1} の波数領域である。シリカゲルの影響を受けない良好なスペクトルを得るためには試料スペクトルと対照スペクトルを測定する際のシリカゲルの性状を同一として、シリカゲル自体の吸収帯をコンピューターにより差引きすればよい。そのため薄層板から削り取るシリカゲル量や対照とするシリカゲルは同一のTLC板より削り取るような注意をはらった。

Fig. 4はシリカゲルに吸着した2,4-DNPヒドラゾンのスペクトルを示したが、Fig. 2と比較して明らかに各吸収帯はよい一致を示したことからTLC板上で薄層スポットをこの方法で同定できることが判明した。しかしFig. 4(B)に見られるように、試料濃度が希薄になるにつれて装置感度を上げるため1600 cm^{-1} 付近に光学系内の水分の影響を受け、スペクトルの解釈と定量精度および検出限界に影響を及ぼすようになる。

3.5 検量線とアルデヒドの平均炭素鎖数

検量線は吸光係数の大きい1339 cm^{-1} のニトロ基による吸収帯を用いて作成した。バンド強度の精度をあげるためベースライン補正法を用いた。検量線は4.3から42ppmの濃度範囲で良好な直線性($y = 0.044x - 0.105$, $r^2 = 0.99$)を示した。各濃度における定量値は5回の平均値であり、8.6ppm濃度での相対標準偏差は16%であった。検出限界は4ppmであり、薄層板に付着したアルデヒドの重量換算で4 μ gである。

微量のアルデヒド試料を2,4-DNPヒドラゾンとした後、TLC操作を行い混合物であることが確かめられる。ついで第二回目の展開操作で薄層スポットを溶媒

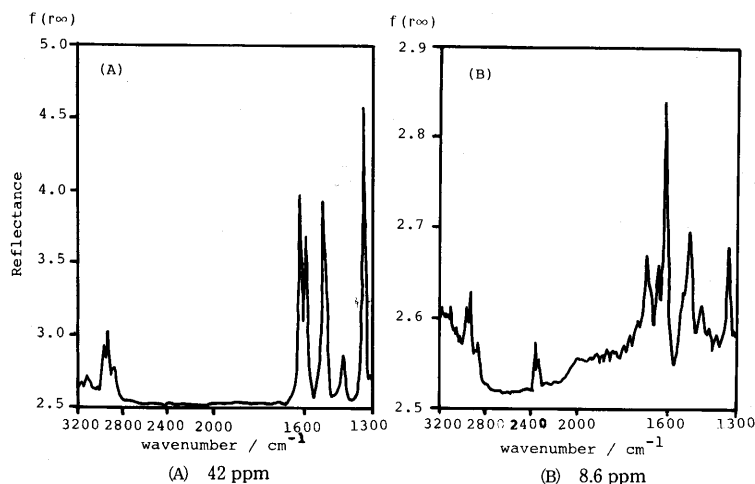


Fig. 4 Kubelka-Munk diffuse reflectance spectra of 2,4-dinitrophenylhydrazones (C2, C4, C6) on silica gel in KBr vs a silica gel in KBr reference.

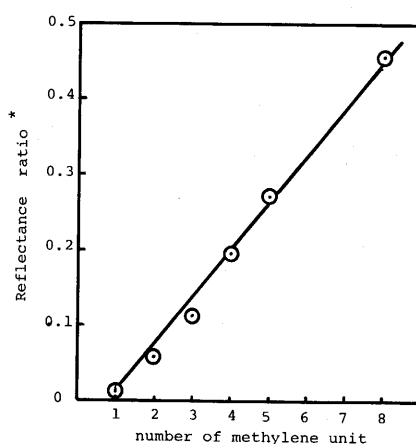


Fig. 5 Calibration curve for a mean chain length of aldehyde
 \bullet $-\text{CH}_2-$ (2855 cm^{-1})/ $\text{C}-\text{NO}_2$ (1339 cm^{-1})

先端に濃縮させる。複雑な混合物の DRIFT スペクトルを本法によって測定ができる。この赤外スペクトルより脂肪族アルデヒドの平均炭素鎖数(メチレン鎖数)を次のように見積もることができる。すなわち、各脂肪族アルデヒドの 2,4-DNP ヒドラゾン (250 μg) を TLC で分離後、ついで第二回目の展開を行った後 DRIFT 測定を行い、得られたスペクトルから νCH_2 (2855 cm^{-1})/ νNO_2 (1339 cm^{-1}) の反射光強度比を求めた。測定したアルデヒドのメチレン ($-\text{CH}_2-$) 数と CH_2/NO_2 比とは Fig. 5 のように直線関係を示した。この関係を用いるアルデヒド-2,4-DNP ヒドラゾン混合物中の平均炭素鎖数を見積もることができる。

このように微量のアルデヒドが混合物であることを確認した後、薄層スポットを濃縮してスペクトルを測定する方法は希薄でかつ微量成分について平均鎖長がもとめられることより有効な分析法と考えている。また、第二回目に二次元展開を行うとそれぞれの R_f 値をもつ化合物ごとに濃縮することもできる。この場合 DRIFT 測定を行えば、類似の R_f 値群についての化合物の赤外スペクトルが得られるためそれらの構造推定

が容易となる。

なお本研究は財団法人実吉奨学会：研究助成金を受けたことを付記し厚く感謝いたします。

(日本分析化学会 第30年会 1981.10 にて一部発表)

文 献

- 1) K. Krishnan, R.Curbelo, P. China, R.C. Noonan: J. Chromatogr. Sci., **17**, 413 (1979)
- 2) 小泉 均, 鈴木義仁: 分化, **32**, 488 (1983)
- 3) 女川 修, 正田訓弘, 石田英之, 石谷 炯: 第41回分析化学討論会講演要旨集, p. 262 (1980)
- 4) M.P. Fuller, P.R. Griffiths: Anal. Chem., **50**, 1906 (1978)
- 5) M.P. Fuller, P.R. Griffiths: Appl. Spectrosc., **34**, 533 (1980)
- 6) G.E. Zuber, R.J. Warren, P.P. Begosh, E.L. O'Donnell: Anal. Chem., **56**, 2935 (1984)
- 7) 間宮真佐人: "化学の領域" **25**, 200 (1971) (南江堂)
- 8) J.K. Kircher: "Thin-Layer Chromatography" p. 378 (1967) (Interscience Pub., New York)
- 9) 武内次夫, 鈴木義仁, 山崎 豊: 分化, **18**, 948 (1969)