

Thin-Layer chromatography에 의한 水溶性 色素의 分析에 關한 考察

—1. Xanthene 系 色素의 分離 및 確認—

서울保健專門學校

具 聖 會 · 李 盛 鎬

Study on the Analysis of Water-Soluble Dyes by Use of the Thin-Layer Chromatography.

—1. Separation and Identification of Xanthene Dyes—

Sung Hoi Koo, Sung Ho Lee

Seoul Health Junior College

=Abstract=

For analysis of Xanthene dyes according to the developing solvent and adsorbent was applied to Thin-layer chromatography with silicagel and cellulose plate.

Silicagel chromato-plate used were prepared under different condition of activation.

Using eight developing solvent, the influence of the condition for activation upon the separation of Xanthene dyes was investigated. The results are shown in Table 3.

Methyl ethyl ketone+Acetone+H₂O (10 : 0.1 : 0.4) mixture and n-butanol+Ammonia water (4 : 1) mixture gave clear separation for Xanthene dyes, including Fluorescein, Erythrosine Rhodamin B, Eosine, Rose bengale, phloxine and Acid red those R_f values decrease in the described order.

Methyl ethyl ketone+Acetone+H₂O (10 : 0.1 : 0.4) was applied to two adsorbents which were purchased from different manufactures.

The results of Chromatograms are obtained Figure 6.

緒 論

水溶性 色素의 分析은 중래 呈色反應¹⁾, 逆相 Chromatography²⁾, 또는 Column chromatography³⁾等으로 하였으나, 最近 Thin-Layer chromatography⁴⁾를 많이 使用하였다. Davidek⁵⁾는 alumina의 plate傾斜法을 使用하여 水溶性 色素를 分離하였고 Montag⁶⁾는 silicagel

을 使用하여 天然色素와 油溶性 色素를 分離하였다. Mieko kamikura^{7,8)}는 油溶性 色素, amine系 有機顔料, 水溶性 色素를 分離하는데 silicagel plate의 結着劑인 plaster of paris가 分離上 沮害要素로 究明하여서 結着劑로 poly vinyl alcohol을 使用한 Silicagel plate나 cellulose plate를 使用하였다. 이처럼 Thin-Layer chromatography에 依한 色素分析에 關한 研究가 많 이 되어 있는데 비해 國內에서는 거의 되어 있지 않는

實情이므로 著者は 食品 添加物로도 使用되어있던⁹⁾ Xanthene系 色素를 Silicagel plate와 cellulose plate를 使用하여 plate의 活性化 條件과 展開劑의 種類에 따른 分離能를 檢討할 目的으로 實驗하여 以下의 結果를 얻었으므로 報告한다.

實驗方法

1. 試料

使用한 色素는 Table 1과 같으며, 0.5% 濃度로 各 各 50% Alcohol溶液에 녹여서 約 0.002ml씩 Spot하였다^{4,9-12)}.

Table 1. Xanthene dyes

No	Dyes	C.I.*(1956)
1	Acid red	45,100
2	Rhodamine B	45,170
3	Fluoresceine	45,350
4	Eosine	45,380
5	Phloxine	45,416
6	Erythrosine	45,430
7	Rose bengale	45,440

* colour Index number¹⁰⁾

Table 2. Adsorbent

No	Commercial Products (Manufacturer)	Adsorbents and distilled water used in the preparation of chromatoplates	
		Adsorbent(g)	Distilled water (cc)
1	Silicagel G (E.Merck)	25	50
2	Cellulose powder(Funakoshi)	20	45

Table 3. Solvent system

No	Solvent system
S-1	Methyl acetate
S-2	Acetone
S-3	Methyl ethyl ketone
S-4	Methyl ethyl ketone + H ₂ O(20 : 10)
S-5	Methyl ethyl ketone + Acetone + H ₂ O(10 : 0.1 : 0.4)
S-6	n-butanol
S-7	n-butanol + H ₂ O(10 : 1)
S-8	n-butanol + Ammonia water(4 : 1)

2. 試藥

Adsorbent는 silicagel G(E.Merck), Cellulose powder(Funakoshi)를 Table 2와 같이 使用하였다. Developing solvent는 Methyl acetate, Acetone, Methyl ethyl Ketone, n-butanol, Ammonia water(以上 E. Merck)를 Table 3과 같이 使用하였다^{4,9-13)}.

3. 器具

展開槽는 plate를 20×20cm의 glass板을 使用할 경우 10cm(縱)×27cm(橫)×2.5cm(高)의 glass槽를 使用했으며 plate作成板은 三田研研社製 5-20型을 使用하고 活性化는 Dry oven(三化工社)를 使用하였다^{4,9-13)}. 水分測定은 赤外線 水分計(K.E.T.T. electric laboratory F-1 A型)를 使用하였다¹⁴⁾.

4. 方法

Adsorbent를 Table 2.와 같이 各 各 約 1分間 잘 섞은 후 0.25mm(250μ) 두께로 20×20cm glass板에 均一하게 塗布한 후 Table 4와 같이 4가지 條件으로 活性化시켰다. 이장과 같이 作成된 plate 위에 Table 1.의 色素를 plate의 밑에서 2.5cm떨어진 線上에 約 1cm간격으로 各 各 spot하였다. 室溫(20°C)에서 Table 3.의 展開劑를 展開槽內에 一定量 넣은 후 飽和狀態가 되면 plate의 下端에서 約 1cm길이로 展開劑가 당도록하여 上昇法에 依하여 溶媒가 spot支點에서 10cm上昇移動할 때 展開를 中止하고 風乾한 후 Rf值를 測定하였다^{4,9-13)}.

實驗結果 및 考察

1. 展開劑의 種類와 分離能과의 關係

Developing solvent로 Methyl acetate, Acetone, Methyl ethyl ketone, n-butanol等 溶媒를 單一로 使用해도 色素의 分離를 불수 있으나 이것은 plate의 活性化에 따라 많은 影響을 미칠 뿐만 아니라 分離能도 저조하며 Xanthene dyes分離에서는 Drip現象을 많이 일으켰다. 그래서 Trappe¹⁵⁾의 溶劑 溶出順位表 中間에 位置한 Acetone과 Methyl ethyl ketone, n-butanol을 Ammonia와 多少 적당히 組合해서 複合溶媒를 使用함으로써 좋은 分離能를 不수 있으므로 Table 3과 같이 組合한 複合溶媒를 使用하였다. 展開距離는 約 10cm程度에서 모든 色素의 分離를 不수 있으나 부족한 경우는 15cm程度의 展開距離로 충분히 판단할 수 있었다. 展開溫度는 Fig. 1에서 보는바와 같이 20°C前後에서 가장 잘 分離되며 15°C以下와 25°C以上일 때는 良好 分離能의 떨어져짐을 不수 있었다. Table 3

Table 4. Separation of Xanthene dyes

No. of solvent system	Temperature of activation			
	room temperature (12hrs)	60°C (1hrs)	100°C (1hrs)	100°C (2hrs)
S-1	—	—	—	—
S-2	+	—	—	—
S-3	+	+	—	—
S-4	∥	∥	+	—
S-5	∥	∥	∥	∥
S-6	+	+	—	—
S-7	∥	∥	+	—
S-8	∥	∥	∥	∥

—: unsuccessful

+: not completely successful

∥: successful

Fig. 2와 같이 "A,"는 100°C에서 2시간, "B,"는 100°C에서 1시간 活性化시킨 plate 로써 色素의 현저한 Drip 現象을 볼수 있었다. 60°C에서 1시간 活性化시킨 "C,"는 Drip 現象의 많은 감소를 볼수 있었다. "D,"는 室溫에서 12시간 風乾한 plate 로써 Drip 現象을 전혀 볼수 없는 Xanthene dyes의 良好한 Chromatograms을 볼수 있었다. 室溫에서 風乾한 plate는 展開劑로 Methyl ethyl ketone이나 n-butanol을 單一로 使用해도 Xanthene dyes의 分離는 可能하나 이것에 3~5%의 물, Acetone ammonia를 適當히 加해서 組合 檢討한 結果 S-5와 S-8의 成分組合比가 最良의 分離能을 볼수 있었다. 이 展開劑를 使用할 경우 展開에 所要되는 時間은 20~30分 程度이다.

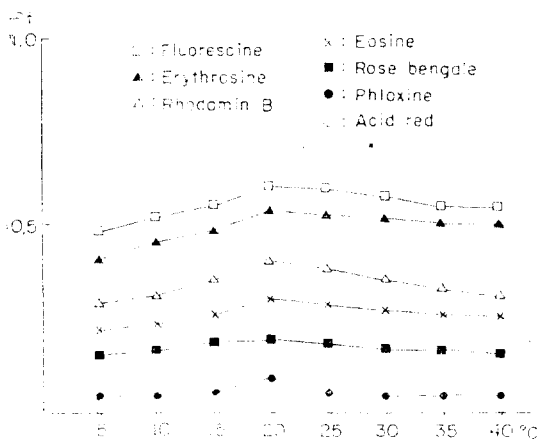


Fig. 1. Influence of the temperature upon the Separation of Xanthene dyes.

Activation condition: Room temperature, air-dried(20°C).

Activation hours: Over night(12hrs)

Adsorbent: Silicagel G(E.Merck)

Developing Solvent: S-5(cf. Table 3)

에 使用한 展開劑를 利用하여 Xanthene dyes에 대한 chromatography를 行한 結果는 Table 4에서 보는바와 같이 展開劑 S-1은 各 plate에서도 phloxine만 移動하고 他色素는 移動치 않았다. S-2는 使用한 plate의 活性化 條件에 따라 室溫에서 活性化시킨 plate에서는 移動하고 그의 plate에서는 移動되지 않았다. S-3과 S-6도 室溫과 60°C에서 活性化시킨 plate에서는 移動하고 그의 plate에서는 移動되지 않았다. S-4와 S-7은 使用한 plate의 活性化 條件에 따라 各各 相異해서

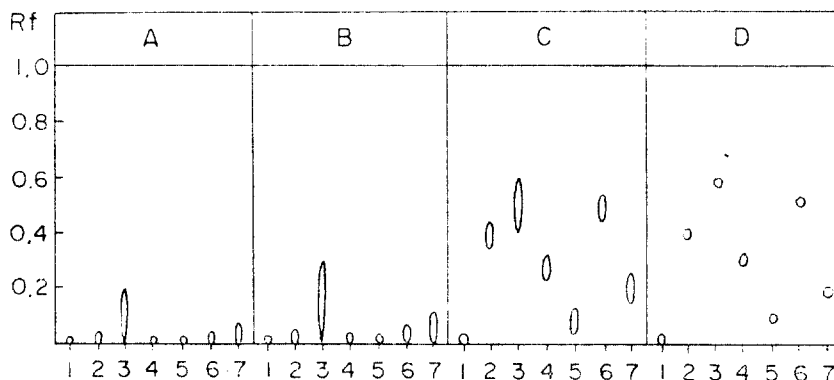


Fig. 2. Chromatograms of xanthene dyes.

Dye: 1: Acid Red 2: Rhodamin B 3: Fluoresceine 4: Eosine

5: Phloxine 6: Erythrosine 7: Rose Bengale

Adsorbents: Silicagel G(E.Merck)

Activation temperature/hours: A: 100°C/2hrs, B: 100°C/1hrs, C: 60°C/1hrs,

D: air-dried(20°C)/over night(12hrs).

2. 薄層의 活性도와 分離能과의 關係

Adsorbent의 活性度の 強弱은 Adsorbent중에 含有한 水分量이 原因이므로 silicagel G를 使用하여 다음 4가지 條件으로 作成 檢討하였다. "A., plate作成後 100°C에서 2時間 加熱한것, "B., plate作成後 100°C에서 1時間 加熱한것, "C., plate作成後 60°C에서 1時間 加熱한것, "D., plate作成後 室溫(20°C, 濕度 40~60%)에서 12時間 風乾한것. Table 4와 같이 Adsorbent의 活性도와 分離能과의 關係는 使用한 plate의 活性度에 따라 展開劑에 많은 影響을 끼쳐 各各 相異한 結果를 볼수 있었다. 展開劑 S-5와 S-8을 使用했을때 plate중에 含有된 水分含量은 各色素의 Rf值에 變化를 招來하였다. Silicagel plate중에 含有한 水分을 赤外線 水分計(K.E.T.T. electric Laboratory F-1 A型)로 測定한

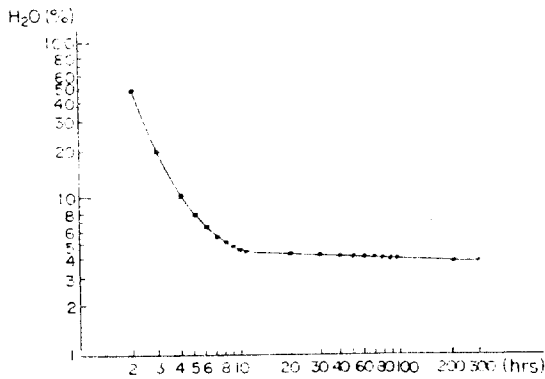


Fig. 3. Water content of an air-dried silicagel G Chromatoplate.

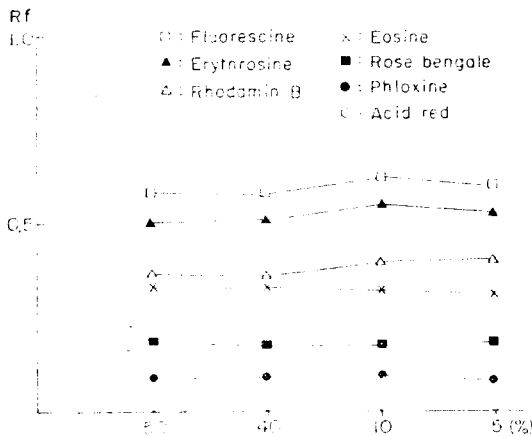


Fig. 4. Relationship between Rf Values and in silicagel chromatoplates.
Developing solvent: S-5 (cf. Table 3)
Adsorbent: silicagel G(E.Merck)

結果 Fig. 3과 같았다¹⁴⁾. Plate作成後 室溫(20°C濕度 40~60%)에 風乾할경우 2時間後의 水分量은 40~50%, 5時間後는 8~10%, 8時間後는 5~6%, 12~15時間後는 4.5~5.5%이었다. Plate作成後 經過時間別로 水分測定後 展開劑 S-5를 使用하여 展開시킨 結果, 水分含量別로 본 Chromatograms는 Fig. 4와 같이 含有된 水分量이 5~10%範圍가 가장 良好한 分離를 했는데 비해 40~50% 範圍에서는 점차 分離能力이 떨어짐을 볼수 있었다. 活性化시키는 溫度에 따른 Xanthene dyes의 Rf值에 對한 影響은 Fig. 5와 같이 20°C, 60°C, 100°C, 150°C에서 各各 1時間 活性化시킬 경우 20°C~60°C範圍가 가장 良好한 分離를 했으며 특히 Erythrosine의 경우는 60°C以上일때 Rf值에 큰 變化를 가져왔다. 150°C以上일때는 全體色素의 分離에 惡影響을 초래하였다.

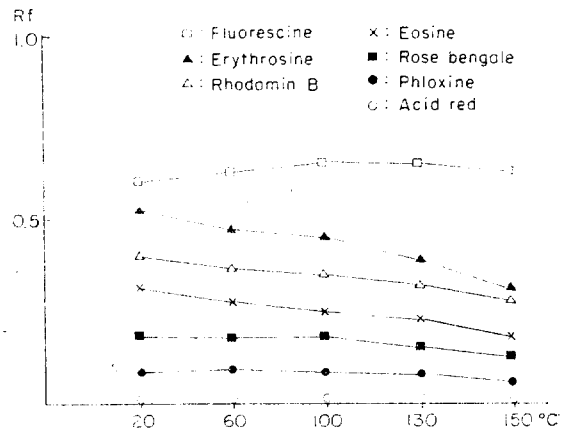


Fig. 5. Relationship between Rf values and temperature of activation of silicagel chromatoplates.

Activation hours/Temperature: 1 hrs(60°C, 100°C, 130°C and 150°C) and overnight (20°C)

Developing solvent: S-5(cf. table 3)

Adsorbent: silicagel G(E.Merck)

3. 薄層의 種類와 分離能과의 關係

Table 2와 같이 silicagel G와 cellulose powder를 使用하여 Xanthene dyes의 分離能을 比較 實驗한 結果 Fig. 6과 같이 silicagel과 cellulose powder의 分離能에 差異가 있음을 볼수 있었다. 이러한 原因은 Adsorbent를 구성하는 粒子的 크기와 Adsorbent속에 含有한 結着劑의 種類와 含量에 따라 相異하다. Kiekokamikura에 依하면 Adsorbent의 粒子的 크기는 全體的인 Rf值에 큰 影響을 주며 silicagel중에 含有한 結着劑인 流酸矽酸(plaster of paris)의 含量 變化도 Rf 值에

結 論

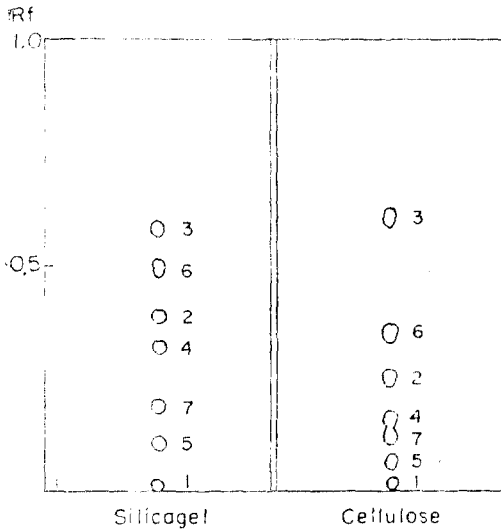


Fig. 6. Chromatograms showing the separation of the dyes on chromatoplates of silicagel and cellulose.
dyes: 1-7(cf. Table 1)
Developing solvent: S-5(cf. Table 3)

影響을 주는 데 含量이 0~5%이면 Erythrosine의 Rf值變化를 招來하고 增加할수록 分離能이 저하한다. 그러나 Fluorescein의 Rf值에는 變化가 없다. 流酸矽素 이외의 結着劑로 澱粉을 使用해도 惡影響을 미치므로 最近에는 polyvinyl alcohol을 使用한다. polyvinyl alcohol을 結着劑로 使用했을 경우 Drip現象이 일어나지 않고 分離能에도 惡影響을 미치지 않는다.

以上の 條件를 참작하고 展開劑 S-3, S-5, S-7 및 S-8을 使用했을 경우 Xanthene dyes의 Rf值는 Table 5와 같다.

Table 5. Approximate Rf values of Xanthene dyes.

No	Dyes	Solvent system			
		S-4	S-5	S-7	S-8
1	Acid red	0.0	0.0	0.0	0.0
2	Rhodamin B	0.39	0.40	0.38	0.37
3	Fluoresceine	0.58	0.60	0.59	0.57
4	Eosine	0.30	0.31	0.31	0.29
5	Phloxine	0.07	0.09	0.08	0.07
6	Erythrosine	0.50	0.52	0.51	0.50
7	Rose bengale	0.18	0.19	0.20	0.18

Thin-Layer chromatography에 依하여 Xanthene dyes를 分析하기 爲하여 Developing solvent의 種類 및 Adsorbent의 種類와 活性도가 分離能에 미치는 效果를 實驗한 結果는 다음과 같다.

1. Developing solvent는 單一溶媒보다 複合溶媒로 使用한 것이 良好했으며 展開溫度는 20°C前後가 最適이었다.

2. Adsorbent의 活性도는 分離能에 큰 影響을 미치며 室溫에 活性化시켜 水分 含有量이 4~10%일 때 가장 良好하였다.

3. silicagel과 cellulose를 Adsorbent로 使用했을 경우 分離能은 相異하였다.

4. Xanthene dyes의 Rf值는 Fluoresceine > Erythrosine > Rhodamin B > Eosine > Rose bengale > phloxine > acid red 順으로 分離되었다.

參 考 文 獻

- 1) 沈吉淳: 衛生化學, 138, 東明社, 1960.
- 2) W. Lindberg: *Z. Lebensmitt-untersuch.* 103, 1, 1956.
- 3) L.S. Weiss: *J. Assoc. offic. Agr. chemists*, 34, 453, 1951.
- 4) E. Stahl: "*Dünnschicht-chromatographie, springer-Verlag*" 1962.
- 5) J. Davidek, J. pokorn, G. Janiček: *Z. Lebensmitt-untersuch.* 116, 13, 1961.
- 6) A. Montag: *ibid.* 116, 413, 1962.
- 7) 藤井清次: 食衛誌 4, 96~135, 1963.
- 8) 神藏美枝子: 食衛誌 7, 338, 1966.
- 9) 李盛鎬: 韓國 環衛誌 1, 14, 1974.
- 10) "colour Index", 2nd Ed., *Society of Dyers & colourists, American Association of Textil chemists & colourists*, 1956.
- 11) E. Demole: *Chromatographie Reviews*, 4, 16, 1961.
- 12) E. Benk: *Alcohol-Ind.*, 78, 2, 43, 1965.
- 13) Worker, N.A.: *J. Sci. Food Agr.*, 8, 422, 1957
- 14) 日本藥學會: 衛生 試驗法 注解, 250, 金原出版社, 1973.
- 15) W. Trappe: *Biochem. Z.* 365, 150, 1940.