ガスクロマトグラフィーによる水中の微量 *p*-クマル酸の 定量法の検討*

片瀬 隆雄， 半谷 高久**

(1974 年 5 月 25 日受理)

μg 量の *p*-クマル酸の分析法を検討した。*p*-クマル酸は、OV-17 を DMCS 処理した Chromosorb W (80~100 メッシュ) に 1.5% コーティングした長さ 2.25m, 外径 4mm のガラスカラムで、カラム温度 220°C 等温で 5 分以内に溶出した。測定精度は、エイコサンを用いた内部標準法で変動係数は 1.87% であった。*p*-クマル酸は、ビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミドでトリメチルシリル化した。1 ppm 以下の *p*-クマル酸水溶液から、分液漏斗で硫酸酸性で *p*-クマル酸をエーテル抽出し、90% 以上の回収率が得られた。トリメチルシリル化剤中には不純物が、抽出に使用する水、エーテル、乾燥剤としての無水硫酸マグネシウム中には相当量 (~ 0.1 ppm) のフタル酸ジブチルが含まれていた。フタル酸ジブチルは目的物質の分析を妨害する場合があるので、最大限除去してから使用する必要があった。*p*-クマル酸トリメチルシリル誘導体の同定には質量分析計を用い、その結果、誘導体は *p*-トリメチルシリロキシケイ皮酸トリメチルシリルエステルであることを確認した。以上の検討の結果から、本法は水中に 30~300 ppb 濃度で遊離の状態が存在している *p*-クマル酸の分析法として採用できることが明らかとなった。

1 緒 言

p-クマル酸を含むケイ皮酸誘導体は、高等植物細胞壁 2 次膜主成分であるリグニンの先駆物質である¹⁾。ケイ皮酸誘導体はケモタクソミーの上で一つの指標となる化合物であり²⁾、さらにリグニン分解後の腐植土じょう化過程における中間生成物として興味をもたれている³⁾。土じょうや植物の研究者は、土じょう生態学的アンタゴニズムの役割⁴⁾、小麦などの根の生育阻害⁵⁾、植物ホルモンである 3-インドリル酢酸酵素活性の役割⁶⁾ に関してこれらの物質に興味をもっている。また、腐植土じょうから浸出するでい炭地帯間けき水の飲用によって発生するといわれているカシン・ベック病の病因物質として *p*-クマル酸の可能性が指摘されている⁷⁾。著者らは、この問題に対して水中 *p*-クマル酸の分析法を確立することを必要と考えた。

p-クマル酸を含めてフェノールカルボン酸 (PCA) の分析は、植物学者により以前から比色法が確立され⁸⁾⁹⁾、最近ではさらに感度のよいけい光法¹⁰⁾も報告されている。しかしこれらの方法は前処理分離操作が必要であり、微

量でしかも迅速に分離・測定する方法としてはガスクロマトグラフィー (GC) がよい。試料を直接 GC に注入する方法^{10) 12)}もあるが、PCA の難揮発性のため、あらかじめトリメチルシリル誘導体化して GC 感度をよくする方法が用いられ、以後トリメチルシリル誘導体化による多くの報告がなされている^{13)~22)}。しかしながら、これらの分析法には μg 量での定量的検討や水中に存在する PCA の分析に応用された例はない。そこで、 μg 量でのトリメチルシリル誘導体化の検討および水中に遊離の形で存在する *p*-クマル酸の微量分析を試みた。

2 試薬、器具および装置

2.1 試薬および器具

p-クマル酸およびメタノール溶液：*p*-クマル酸は東京大学農学部森謙治助教授より提供されたもので、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒドとマロン酸ジエチルから合成、3 回再結晶精製されている。この 78.3 mg を精ひょうし 50 ml メタノール溶液とした。さらにこの 2 倍および 10 倍希釈液を調製した。

エイコサンおよびエーテル溶液：エイコサンは東京化成市販品 (TCI, standard hydrocarbon kit, NP-3) を 15.9 mg 精ひょうし 50 ml エーテル溶液とした。

トリメチルシリル (TMS) 化剤：ビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (BSTFA, Ohio-Valley 社市販品) を用いた。

* フェノールカルボン酸の微量分析法 (第 1 報)

** 東京都立大学理学部化学教室：東京都世田谷区深沢 2-1-1

エチルエーテル：残留農薬用試薬（和光純薬）。

メタノール：残留農薬用試薬（和光純薬）。

無水硫酸マグネシウム：特級試薬をエーテルで洗浄後、洗浄液中に測定領域でフタル酸ジブチル（DBP）の存在していないことを GC で確認したのちに使用した。

硫酸：市販特級品。

水：硫酸希釈，器具洗浄水は総ガラス製蒸留装置で水道水を再蒸留したものを使用した。

固定相担体・液体：1.5% OV-17 (Chromosorb W, 80~100 メッシュ, DMCS 処理) (ガスクロ工業社市販品)，1.5% OV-1 (同担体，同処理，同社市販品)。

カラム：ガラス製 2.25m，外径 4mm および 2m，外径 3mm。

TMS 化反応管：円筒型平底かつ色 1 ml ガラスアンブル (ERK カタログ No. 728) を 300°C，20 分間焼いて有機物を除去後使用した。

2.2 装置

ガスクロマトグラフ：島津製 GC-3AF 型（水素炎イオン化検出器）ガスクロマトグラフ。

質量分析計：LKB 9000 型ガスクロマトグラフ直結質量分析計（GC-MS，島津製作所製）。

3 分析法

3.1 抽出

3~30 μg の *p*-クマル酸を含む水 100 ml を 200 ml 分液漏斗にとり，約 7*N* 硫酸で pH 2 に調整し，100 ml のエーテルを加えて振とう機を用いて 10 分間抽出した。抽出残液は，さらに 50 ml エーテルを用いて同様に 2 回再抽出した。3 回の抽出液を合わせ，同液中の水分を除去するために無水硫酸マグネシウム 10 g を加え約 30 分間放置した。デカンテーションで無水硫酸マグネシウムを除き，それを少量のエーテルで 6~7 回洗浄し洗液を抽出液と合わせ，ロータリーエバポレーターを用いて 40~45°C 湯浴中でエーテルがほとんどなくなるまで濃縮した。

3.2 TMS 化反応管への移し替え

3.1 で得た *p*-クマル酸濃縮物を，TMS 化反応管に移すために，まず 50 ml コルベンにエーテルを用い移し替えふたたびロータリーエバポレーターで濃縮しておき，その濃縮物を 1 または 2 ml ホールピペットを用いて，約 0.2 ml のエーテルで 5~6 回くりかえし残りなく 50 ml コルベンから反応管に移し替えた。移し替えに用いたエーテルを減圧デシケーター中であらかじめ半量にしてから，内部標準物質としてエーテル溶液から一定既知量のエイコサンを反応管に加えてよく振とうかき混ぜて，ふたたび減圧デシケーター中で溶媒を留去した。

3.3 TMS 化

3.2 で得た反応管中の濃縮物の水分を完全に取り除くために，反応管中へ乾燥窒素ガスを送り込み，外側をヘアドライヤーで暖めた。反応管に，BSTFA 50 μl を加え，反応管を封じて 10~20 分間，100°C オープン中で TMS 化反応を行なわせた。

3.4 同定

p-クマル酸の同定のために 3.3 で TMS 化した試料のマススペクトル (MS) をとり，標準物質の TMS 化物と比較した。

3.5 GC および GC-MS 操作条件

カラムは常法に従って作製し，250°C で 4 時間以上コンディショニングした。GC および GC-MS の操作条件を Table I に示す。

Table I Operational conditions for GC and GC-MS analysis of *p*-coumaric acid trimethylsilyl derivative

	GC	GC-MS
Column	Glass, 2.25 m $\times$ 4 mm, O. D.	Glass, 2 m $\times$ 3 mm, O. D.
Stationary phase	OV-17, 1.5%†	OV-1, 1.5%††
Supporter	Chromosorb W, 80~100 mesh†††	Chromosorb W, 80~100 mesh†††
Column temperature	200°C	~200°C
Range and sensitivity	$1.6 \times 10^2 \sim 0.4 \times 10^3$	(MS: Gain 6)
Sample size	3 μl	—
Chart speed	20 mm/min	—
Ionization voltage	—	70 eV
Ionization temperature	—	310°C

† OV-17: Methyl-phenyl siloxane (phenyl contents, 50%);

†† OV-1: Methyl siloxane polymer; ††† Supporter treatment: AW-DMCS

4 結果および考察

4.1 ガスクロマトグラフの定量性

4.1.1 RWR の精度 内部標準物質エイコサン 79.5 μg を用いて，78.3 μg の *p*-クマル酸を TMS 反応させ，Table I の条件 (GC 注入量 *p*-クマル酸 1.52 μg ; 記録計レンジ 3.2×10^2) で，3 週間に 6 回分析して得られた GC レラティブ・ウェイト・レスポンス (以下 RWR と略記し，*p*-クマル酸誘導体の重量あたりのピーク高とエイコサンの重量あたりのピーク高の比を示す) の値の精度は，標準偏差 0.0196，変動係数 1.87% であった。

4.1.2 検量線 エイコサン一定量に対して，*p*-クマ

Fig. 1 Calibration curve of a mixture of *p*-coumaric acid and eicosane

ル酸の量を変化させて得られたピーク高変化との相関, すなわち検量線は Fig. 1 に示したように直線性を示した。この直線のこう配は RWR 値を示す。したがって, 試料中の未知量の *p*-クマル酸は, 次式によって求められる。

p-クマル酸水中濃度 (ppb)

$$\frac{1}{\text{RWR}} \times \frac{A_{\text{p-クマル酸}}}{A_{\text{エイコサン}}} \times \text{エイコサン添加量} (\mu\text{g})$$

$$= \frac{\text{試料量} (l)}{\text{試料量} (l)}$$

ここに, A: ピーク高さ, RWR: 1.04.

上式による定量適応限界の検討のために *p*-クマル酸の最も少ない量として 0.78 μg (GC 注入量 0.05 μg) に対する RWR 値を求めると 0.4 となり, エイコサンに対して *p*-クマル酸の感度が減少した。したがって, その影響を受けない 2 μg 以上を定量領域とした。

4.2 質量分析計による同定

3.3 で得られた試料の MS は, *m/e* 308 (22.5%; *m/e* 70 より大きいイオンピーク強度の総和に対する % 表示で以下同じ), *m/e* 293 (32.5%), *m/e* 249 (13.8%), *m/e* 219 (10.8%) がおもなピークであった。*m/e* 308 のスペクトルは, *p*-クマル酸 TMS 誘導体が *p*-トリメチルシリロキシケイ皮酸トリメチルシリルエステル (分子量 308) であることを示した。これらの結果は, すでに報告された PCA に関するマスフラグメントの情報^{(16)(20)~(22)}ともよい一致を示した。

4.3 ブランク物質の存在と GC 用カラムの検討

東京化成社から得た市販 TMS 化剤 (TMS-HT, TMS-BA, および BSTFA) を使って, Table I の条件で操作すると, これらの TMS 化剤中には不純物が存在していることを示した。この物質は未同定である⁽²³⁾が, OV-17 カラムでは目的物質の GC 保持時間と一致し, *p*-クマル酸の分析を妨害した。OV-1 カラムはこの不純物ピークと目的物質ピークとの分離は可能であった。また操作過程で使用するその他の試薬および洗浄用合成洗剤, 洗浄用水などにはフタル酸ジブチル (DBP) が存在していた⁽²³⁾。この DBP ピークは OV-1 カラムでは目的物質のピークと完全に一致したが, OV-17 カラムでは分離した (Table II)。TMS 化剤の検討の結果, Ohio-Valley 社および Piacet 社の BSTFA およびピストリメチルシリルアセトアミド (BSA) には, Table I の操作条件において不純物の存在を認めなかったため, TMS 化剤として Ohio-Valley 社の BSTFA を用いた。Birkofer⁽²⁴⁾, Smith⁽²⁵⁾ らは BSA 中の不純物について検討しているが, それらの場合の不純物は GC 保持時間から推測して本実験の場合の不純物より揮発性であるといえる。BSTFA を用いたアミノ酸分析において Gehrke⁽²⁶⁾ らも TMS 化剤中不純物質の存在を確認している⁽²⁶⁾。

Table II Separation of *p*-coumaric acid TMS-derivative from the contaminant, DBP, on OV-17 column

Column	OV-17 (1.5%)			OV-1 (1.5%)		
Column temperature (°C)	180	180	200	170	170	150
Carrier gas pressure (kg/cm ²)	0.6	1.0	1.0	0.75	0.4	0.4
Retention time (min)						
<i>p</i> -Coumarate derivative	4.9	4.6	2.3	2.0	3.3	7.8
DBP	8.2	7.8	3.8	2.0	3.3	7.9

カラムの選択にあたって以上のことを検討した結果, DBP は各操作上 また多くの試薬などから完全に除去するのに労が多いので, 目的物質と DBP を分離することができる OV-17 を定量用カラムとして選択した。

4.4 内部標準物質の検討

GC 測定用内部標準物質は, エイコサンのほかにドコサン, テトラコサンならびに 2-ヒドロキシ-3- および 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸を検討した。3.3 の TMS 化反応条件で TMS 化した 2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸 TMS 誘導体の GC レスポンスは, 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸 TMS 誘導体に比較して 0.6 であった。ドコサン, テトラコサンは目的物質に比べて保持時間が長か

った。さらに、2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸の TMS 誘導体は、燃焼残さの炭素が検出器に付着する傾向を示したので、内部標準物質として検討した物質のなかで最も適していると思えるエイコサンを採用した。

4.5 TMS 誘導体化反応の検討

4.5.1 TMS 誘導体化法の採用 通常誘導体化法として用いられているジアゾメタンによるメチル化法を試みたが、水酸基に対するエーテル化に 24 時間を要した。そこでカルボキシル基をあらかじめメタノールと三フッ化ホウ素でメチル化後（ジアゾメタンを使用すると、一部水酸基がメチル化するためメタノール-三フッ化ホウ素を使用）、ヘプタフルオロブチル化および TMS 化を行なった。しかしこの方法は操作が 2 段階になるので複雑になり、さらに検出感度において本法と比較してそれほど良好ではなかった。したがって、強力な TMS 化剤である BSTFA を用いることによって本法のジ-TMS 化法を採用した。

4.5.2 TMS 化反応時間の検討 3.3 で示した TMS 化反応時間 10~20 分のほかに 5, 40, 80 分で行なった。反応時間による誘導体ピーク高の変化は Fig. 2 に示すようにほとんど認められなかった。長時間の反応は、目的物質のシス異性化を起こすことを考慮して、3.3 で示した 10~20 分を採用した²³⁾。

Fig. 2 Effect of reaction time of trimethylsilylation of *p*-coumaric acid on peak height ratio

4.6 測定時間における誘導体分解の影響

一般に TMS 誘導体は、空気中の水分などの影響を受け容易に加水分解される傾向がある。したがって、GC による測定時間の間にどのような影響を与えるか調べた。3.3 で TMS 化させた試料のはいつている反応管

を開封直後に測定してから開封状態のまま室温で放置し、その時間によってピーク高にどのような影響を与えるか調べた。その結果を Fig. 3 に示したが、60 分前後では測定値のばらつき程度であるが、100 分後では明らかなピーク高の減少を示した。さらに、開封直後測定し、ふたたびキャップ付きバイアルびんに入れ窒素ガスを充てん後密封し、冷蔵庫中に 1 週間保管した試料はピーク高に変化がなかった。本法による GC 測定時間は 5 分程度であるが、1 時間以上試料を室温に放置するような場合には、キャップ付きびんあるいはアイスボックスに試料を入れるようにした。

Fig. 3 The degradation curve of *p*-coumaric acid trimethylsilyl derivative exposed to a room atmosphere

4.7 溶媒留去にともなう影響

μg 量の *p*-クマル酸の一定量を常にひょう量することは困難であるが、メタノール溶液からはかりとる場合メタノールの存在は *p*-クマル酸の TMS 化反応を妨害するのでメタノールを除去することが必要となる。除去に用いた減圧デシケーター (20 mmHg 減圧) による減圧時間の影響を調べるために、2, 2.5, 5 および 7 時間と減圧時間を変えた。結果を Fig. 4 に示したが、留去時間によってピーク高は影響されないといえる。しかし 7 時間後の試料については同一サンプルで 4% のばらつきが見られた。したがって、*p*-クマル酸の溶媒留去にともなう損失あるいはばらつきを防ぐために、留去時間は最大 5 時間とした。

4.8 抽出と回収率

4.8.1 抽出法の検討 PCA に関する抽出溶媒は、

Fig. 4 Effect of solvent-removal time on peak height ratio

エーテル²⁷⁾, 酢酸エチル²⁸⁾, ジクロロメタン²⁹⁾, ジオキサン³⁰⁾などが使われているが, 定量的ルーチン分析の目的に対して本法で採用したエーテルのほかに酢酸エチルとジクロロメタンについて検討した。7.9 ppm *p*-クマール酸水溶液を調製し, 3:1 に従って行なった各抽出溶媒による回収率は, それぞれ 95, 98, 60% であった。回収率において酢酸エチルが最もよかったが, 操作上溶媒留去のしやすいエーテルを採用した。

溶媒抽出法として, 分液漏斗によるバッチ法²⁷⁾²⁸⁾, 液液抽出器による連続抽出法³¹⁾³²⁾ および還元蒸留法³⁰⁾などによる報告があるが, 本目的に対して分液漏斗法 (A法とする) および液液抽出器法 (B法とする) について検討した。A法は市販 200 ml 分液漏斗で, B法は著者らの設計図に従って日京製作所で作製した 6 l 用液液抽出器を用いた。液液抽出器は 30~40 時間連続運転させた。*p*-クマール酸水溶液濃度が 30 ppb で, 抽出溶媒にエーテルを用いた場合の回収率は, A法が 94%, B法が 48% であった。したがって, 簡便で回収率のよい分液漏斗による抽出法を採用した。

4.8.2 添加回収実験 *p*-クマール酸を添加した希薄蒸留水溶液および天然水 (でい炭間げき水) 溶液から 3:1 の分析法に従って行なった分析の結果を Table III に示した。6 回の平均回収率は 93.3%, 変動係数 5.35% で, 天然水に限定すると回収率は 91.7%, 変動係数は 7.16% で, 天然水の場合ばらつきは大きくなった。しかしながら, 10% 以下のばらつきであることは本目的に対する分析法として妥当と考える。Fig. 5 に典型的なガスクロマトグラムを示す。a は天然水に *p*-クマール酸を添加したクロマトグラムで, b, c は添加しない蒸留水および天然水のエーテル抽出物を示している。b, c

Table III Recoveries of *p*-coumaric acid from extraction

No. (Water)	<i>p</i> -Coumaric acid		Recovery (%)
	Taken (μ g)	Found (μ g)	
1 (Distilled water)	31.4	29.6	94.3
2 (")	31.4	29.6	94.3
3 (")	3.14	3.02	96.2
4 (Natural water†)	31.4	27.2	86.6
5 (")	31.4	31.8	101
6 (")	3.14	2.75	87.6
Average ($\bar{x}$)			93.3
Standard deviation (σ)			4.99
Coefficient of variation ($C=\sigma/\bar{x}\times 100$)			5.35

† Natural water; A well-water exuded through peat pag areas

Fig. 5 A typical gas chromatogram of *p*-coumaric acid trimethylsilyl derivatives

Sample: (a) Extract from natural water (31.4 μ g *p*-coumaric acid added), (b) extract from distilled water (no *p*-coumaric acid added), (c) natural water; Peak: (1) *cis-p*-Coumaric acid, (2) eicosane, (3) *p*-coumaric acid, (4) dibutyl phthalate (contaminant); Column: OV-17 (1.5%); Operational conditions: Shown table I

から測定領域には *p*-クマール酸の分析を妨害するピークが存在しないといえる。本法によって試みた天然水中の遊離の形で存在する *p*-クマール酸の濃度は 10 ppb 以下であった。

5 結 語

水中に遊離の形で存在している μ g 量の *p*-クマール酸の分析法を検討した。その結果, 2 μ g 以上の *p*-クマール酸をあらかじめトリメチルシリル化し, ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器) を用いて定量的に分析で

きることがわかった。微量分析に際しては、TMS 化剤やその他の試薬中あるいは操作の過程で混入する不純物が分析を妨害したが、本法によってそれを取り除くことができた。*p*-クマル酸のシス異性化がガスクロマトグラフの使用で起こったが、本法の条件においてその影響は4.1・1で示した変動係数以下であった。しかし今後、PCA 混合物を同時に昇温分析するような GC 条件で分析する場合に、この異性化現象はあらかじめ考慮する必要があるといえる。

終わりに、*p*-クマル酸を提供された東京大学農学部森謙治助教授、ならびに誘導体化法について助言を賜った東京工業大学理学部池川信夫助教授に感謝します。

(1970 年 10 月、地球化学討論会において一部講演)

文 献

- 1) 水上茂樹ら編：“Metabolic Maps”，p. 42, 57 (1968)，(共立出版)。
- 2) E. C. Bate-Smith, R. G. Westall : *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 427 (1950)。
- 3) H. Morita : *Cand. J. Biochem.*, **43**, 1277 (1965)。
- 4) B. T. Lingappa, L. T. Lockwood : *Phytopathology*, **52**, 297 (1962)。
- 5) M. H. Zenk, G. Muller : *Nature*, **200**, 961 (1963)。
- 6) H. Börner : *Naturwiss.*, **42**, 583 (1955)。
- 7) 滝沢延次郎著：“日本におけるカシン・ベック病の研究”，p. 83 (1970)，(緒方書店)。
- 8) T. Swain, W. E. Hillis : *J. Sci. Fd. Agri.*, **10**, 63 (1959)。
- 9) R. W. Keith, et al. : *J. Chromatog.*, **1**, 534 (1958)。
- 10) B. F. Hrutford : *Tappi*, **48**, 48 (1965)。
- 11) J. Mendez, F. J. Stevenson : *J. Gas Chromatog.*, **4**, 483 (1966)。
- 12) F. J. Stevenson, J. Mendez : *Soil Sci.*, **103**, 383 (1966)。
- 13) Z. Horii, et al. : *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **13**, 636 (1965)。
- 14) E. R. Blakly : *Anal. Biochem.*, **15**, 350 (1966)。
- 15) R. A. Andersen, G. Moegling : *ibid.*, **27**, 397 (1969)。
- 16) E. D. Pellizzari, et al. : *J. Chromatog.*, **40**, 285 (1969)。
- 17) R. F. Coward, P. Smith : *ibid.*, **45**, 230 (1969)。
- 18) N. F. Cymbaluk, T. S. Neudoerffer : *ibid.*, **51**, 167 (1970)。
- 19) R. A. Andersen, T. H. Vaughn : *ibid.*, **52**, 385 (1970)。
- 20) R. D. Hartley : *ibid.*, **54**, 335 (1971)。
- 21) J. C. Lhuguenot, et al. : *Chromatographia*, **4**, 204 (1971)。
- 22) H. Morita : *J. Chromatog.*, **71**, 149 (1972)。
- 23) 片瀬隆雄，半谷高久：未発表。
- 24) L. Birkofer, et al. : *Angew. Chem.*, **75**, 93 (1963)。
- 25) E. D. Smith : *J. Chromatog., Sci.*, **10**, 34 (1972)。
- 26) C. W. Gehrke, et al. : *J. Chromatog.*, **45**, 24

(1969)。

- 27) D. C. Whitehead : *Nature*, **202**, 417 (1964)。
- 28) M. D. Armstrong, et al. : *J. Biol. Chem.*, **218**, 293 (1956)。
- 29) R. I. Morrison : *J. Soil Sci.*, **14**, 201 (1963)。
- 30) H. Ishikawa, et al. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 131 (1963)。
- 31) R. K. Ibrahim, G. H. N. Towers : *ibid.*, **87**, 125 (1960)。
- 32) C. H. Yang, H. Wender : *J. Chromatog.*, **8**, 82 (1962)。

☆

Microdetermination of *p*-coumaric acid in water by gas chromatography. Takao KATASE and Takahisa HAN-YA (Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, 2-1-1, Fukasawa, Setagaya-ku, Tokyo)

Analytical method of *p*-coumaric acid in water was studied in a microgram scale.

p-Coumaric acid in a distilled or natural water was quantitatively extracted with diethyl ether. The concentrations of *p*-coumaric acid in water were approximately thirty to three hundred microgram per liter (ppb) and a 200 ml-separation funnel was used for its extraction from water. The extract was allowed to stand for 30 min in contact with anhydrous magnesium sulfate. Then, from the dried extract was removed the ether with a rotary-evaporator. The condition was kept for removing less than 40°C.

p-Coumaric acid was trimethylsilylated with *N*-, *N*-, bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) for gas chromatography. Fifty microliter BSTFA was reacted with *p*-coumaric acid in a closed ampoule for 5~10 min at 100°C in an oven.

The trimethylsilyl(TMS)-derivative of *p*-coumaric acid was eluted in 2.3 min at 200°C on a glass column 2.25×4 mm (o.d.) containing 1.5% OV-17 on Chromosorb W with a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. The concentration was calculated by relative weight response (WR). Eicosane was used as an internal standard substance. The calibration curve was linear for *p*-coumaric acid in the range of the injection size 0.1~5 µg. The coefficient of variation for the RWR was within 2%. The *p*-coumaric acid TMS derivative was identified *p*-trimethylsilyloxy cinnamate TMS ester with gas chromatograph-combined mass spectrometer.

Recovery of average 93% was obtained and the coefficient of variation was 5.4% running six times. This recovery was obtained at extraction from a distilled water and fresh water of addition of *p*-coumaric acid up to approximately 30 and 300 ppb levels. There occurred less than 10 ppb concentration of not-combined but free *p*-coumaric acid in an attempted natural water by this method.

In this case of microanalysis, it was necessary in advance to remove a contaminant, dibutyl phthalate (DBP), contained in an ion-exchanged water and anhydrous magnesium sulfate, for the elution time of DBP on OV-1 column coincided with that of *p*-coumaric acid TMS-derivative. The peak of DBP was

separated on OV-17 column. Another contaminant was the impurity of trimethylsilylation reagents and this peak was overlapped with that of *p*-coumaric acid TMS-derivative on OV-17. The impurity were not

found in BSTFA obtained from Ohio-Valley Company (U. S. A.).

(Received May 25, 1974)

ウリカーゼ-ペルオキシダーゼ系と 4-メトキシ-1-ナフトール とを用いる尿酸の定量法

木下俊夫, 飯沼文夫, 山之端万里, 辻 章夫*, 加藤元彦**

尿酸にウリカーゼを作用させて生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下に 4-メトキシ-1-ナフトールに作用させて発色させる比色定量法を開発した。本法では, ペルオキシダーゼ量がきわめて少なくすむので, ウリカーゼ, ペルオキシダーゼ, 色素の三者を同時に試料に加えて反応させることができ, 従来の方法に比べてはるかに迅速, 簡便である。また本法で使用した色素は酸化されると 620 nm に極大吸収を示すので, 生体試料の着色などによる妨害も少ない。検量線は 5~70 μg の間で直線性を示す。血清, 尿からの回収率は良好で, 血清については除たん白操作なしで定量できる。

1 緒 言

尿酸の定量は核酸代謝の研究に有用であるだけでなく, 疾病の診断にも重要な役割を持っている。従来最もよく知られているのは痛風¹⁾における高尿酸血症であるが, 先天性代謝異常の一つである Lesch-Nyhan 症候群²⁾や白血病³⁾などにおいても血中尿酸値の上昇と尿中尿酸量の増加が認められる。特に最近じん不全³⁾に対する透析療法の進歩にともない, 透析の管理における一つの指標として血中, 尿中の尿酸量の測定の必要性は増大しつつある。

尿酸の定量法にはリンタングステン酸を用いる化学的方法⁴⁾とウリカーゼを用いる酵素的な方法⁵⁾とがあり, 後者は特異性が高い点ですぐれている。従来酵素法では, 主として 290~293 nm での尿酸の吸光度を用いる測定法^{6,7)}が多く用いられてきたが, 紫外部の吸収を用いるので生体試料への応用には難点があった。そこでウリカーゼとペルオキシダーゼ (POD) あるいはカタラーゼとの組み合わせを用い, 尿酸の分解の際に生成する過酸化水素を発色剤と反応させて呈色させる方法が提案された。ウリカーゼ-POD 系に対する発色剤としては, まずオルトジアニシジンが用いられた^{8,9)}。これは感度の

高い試薬であるが, ウリカーゼ阻害作用がある。さらにベンジジン系の色素であるため発がん性を含む毒性のおそれがあり, 日常分析の試薬としては難点がある。そこで次にトリブロモフェノールとアミノアンチピリンを用いる方法⁹⁾や 3-メチルベンズチアゾリノンヒドラゾンを用いる方法⁹⁾が報告されたが, 前者は試液を 3 回にわたって別々に加えなければならないうえ, 比較的短波長部の吸収を用いているため, 生体試料の着色の影響を避けるための色素抽出操作が加わり, かなり煩雑である。後者は試薬がアミン, フェノールなどとも反応するので, 特異性が高いとはいえない。ウリカーゼ-カタラーゼ系を用いる定量法では, 呈色にアセチルアセトンを用いており¹⁰⁾, 試薬の添加は一度ですむので簡便であるが, 生成する色素の極大吸収波長が 410 nm と短波長側にあるため, 生体試料や着色試料の場合は妨害を受けやすい欠点がある。

著者らは Guilbault ら¹¹⁾により POD の活性測定に用いられた 4-メトキシ-1-ナフトール (4MN) をウリカーゼ-POD 系と組み合わせることにより, 迅速, 簡便な尿酸定量法を確立した。

2 実 験

2.1 試薬および装置

試薬: ウリカーゼ (活性 0.64 単位/mg) および,

* 昭和大学薬学部: 東京都品川区旗の台 1-5-8

** 盛進製薬株式会社: 東京都中央区日本橋蠣殻町 1