報 文

オイゲノール, シス-およびトランス-イソオイゲノールの
ガスクロマトグラフィーによる定量分析

湖上国雄・青木一男・高橋辰治・熊野谿 従

東京大学工学部総合試験所 (東京都文京区弥生町)

Quantitative Analysis of the Mixture of Eugenol, *cis*- and *trans*-Isoeugenol
by Gas-Liquid Chromatography with the Thermal Conductivity Detector

Kunio KOGAMI, Kazuo AOKI, Shinji TAKAHASHI and Jū KUMANOTANI

The Engineering Institute Research, Faculty of Engineering, University of Tokyo
(Yayoi-chō, Bunkyo-ku, Tōkyō)

This paper describes quantitative analysis of a mixture of eugenol, *cis*- and *trans*- isoeugenol by gas-liquid chromatography with the thermal conductivity detector using silicone D.C. 550, D.O.S., Apiezone L., P.E.G. 1500 and 4000, and D.B.P. as the liquid substrates. The following results were observed.

Every liquid substrate was used individually or in combinations of two or three. In the latter cases, the substrates were utilized in a mixed manner and in repeated coating with each of two or three substrates, resulting in the finding upon analysis that D.C. 550 and D.O.S. (mixed) gave excellent results.

Twenty four samples of substrates were examined for retention time in the gas chromatograms in comparison with those of eugenol and *cis*- and *trans*- isomers of isoeugenol. Among them, carvone, acetyleneugenol, diethyl phthalate, *n*-propyl cinnamate and showed different retention time as compared with those of homologues of eugenol. Thus these substrates indicated as usable, as the inner standard material in the quantitative analysis of gas chromatography.

Upon analysis, acetyl eugenol showed migration of the acetyl group to isoeugenol in the sample, resulting in acetyl isoeugenol. Carvone and *n*-propyl cinnamate were found as preferable rather than diethyl phthalate because of less tailing and shorter retention time in gas chromatograms. But carvone was apt to scale out in gas chromatograms even when used in low weight-ratios for a sample measured.

Quantitative analysis of the sample prepared (eugenol : *cis*-isoeugenol : *trans*- isoeugenol=29.8:33.8:36.4) was carried out within relative experimental errors of $\pm 1.5\%$, using *n*-propyl cinnamate as an inner standard material.

No transformation was seen between *cis*- and *trans*- isoeugenol in these analyzing procedures.

1 緒 言

オイゲノール, シス- およびトランス-イソオイゲノール混合物の定量分析は, つぎに示したように合成反応の工程管理および香料原料としての品質分析の上に重要である。

1) オイゲノールの異性化によるイソオイゲノールの合成。

2) アセチルイソオイゲノールがシスあるいはトランス異性体により香気を著しく異にする。

オイゲノール, シス- およびトランス-イソオイゲノールの機器分析に関連した研究に Y.R. Naves の研究がある。かれはシス- およびトランス-イソオイゲノールの赤外および紫外線吸収スペクトル, ガスクロマトグラムなどにおけるそれぞれの化合物の特性を明らかにした¹⁾。

われわれはこの報告でオイゲノール, シス- およびトランス-イソオイゲノールの混合物のガスクロマトグラフィーによる定量分析法を確立することを目的としてつぎの点について研究を行なった。

1) シス- および トランス-イソオイゲノール を分離しうるカラムを見だし、さらに測定条件を検討する。

2) 定量分析に用いる内部標準物質の選択, 内部標準物質を用いるオイゲノール, シス- および トランス-イソオイゲノールの検量線の作成およびオイゲノール, シス- および トランス-イソオイゲノール 混合物の定量分析。

3) ガスクロマトグラム測定中における シス-イソオイゲノールのトランス体への異性化の可能性。

2 実験結果および考察

2.1 純物質の調製

1) トランス-イソオイゲノール

オイゲノール 164 g (1 mol) にその 1/2 重量の粒状水酸化カリウム (試薬一級) を加え, 165°C に 30 min 加熱して得られる²⁾反応生成物を 1.5 mol の水酸化ナトリウムを含む 15% 水溶液に溶解したのち冷却し, 析出する結晶をこしとる。この結晶を熱水に溶解し室温にまで放冷し, この水溶液をベンゼンとよく振ったのちベンゼン層とアルカリ水溶液層を分ける。分けたアルカリ水溶液は氷冷し, 析出する結晶をこしとる。結晶はさらに熱水より再結晶を行ない トランス-イソオイゲノールのナトリウム塩を得る³⁾。このトランス-イソオイゲノールのナトリウム塩を水に溶解して 10% 水溶液とし, ナトリウム塩と等重量のベンゼンを加えて氷冷下にかくはんしながら 10% 硫酸を加える。遊離したトランス-イソオイゲノールのベンゼン抽出液を水洗後, 5% 炭酸ナトリウム水溶液 100 ml で, ついで水で洗浄しベンゼン液に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ベンゼン液からベンゼンを回収し, さらに回転精留塔 (バンド 6 mm, 長さ: 1.5 m, 回転数: 2,500 rpm, スループット: 80~90 ml/hr, 圧降下: 2 mmHg, 還流比: 30:1, 10:1, 減圧度:

6 mmHg) を用いて精留し純トランス-イソオイゲノール¹⁾ (bp 123°C/6 mmHg, d_{20}^{25} 1.0792, d_D^{25} 1.5705) を得た。

2) シス-イソオイゲノール

1) においてトランス-イソオイゲノールのナトリウム塩をこし分けた際に得られたアルカリ水溶液をベンゼンで抽出したのち, トランス-イソオイゲノールを得たと同じように処理して得た油状物を 2 回, 回転精留に付し bp 116°C/6 mmHg (d_{20}^{25} 1.0787, n_D^{25} 1.5628) の留分を純シス-イソオイゲノール^{1), 3)} として得た。

3) オイゲノール

クローブ油より常法⁴⁾ により得たオイゲノールを回転精留に付し bp 111°C/6 mmHg (d_{20}^{20} 1.0681, n_D^{20} 1.5408) の留分を純オイゲノール¹⁾ として得た。

4) ケイ皮酸-*n*-プロピル

n-プロピルアルコール (試薬一級) と ケイ皮酸 (mp 133°C) のエステル化反応により合成した。その物理定数は bp 136°C/6 mmHg, d_{20}^{20} 1.0293, n_D^{20} 1.5498 で, エステル価から求めた純度は 100% である⁵⁾。

2.2 ガスクロマトグラフィーによるオイゲノール, シス-およびトランス-イソオイゲノール分離条件の検討

熱伝導度型検出器のガスクロマトグラフ, コタキ GU 21 型を用いオイゲノール, シス- およびトランス-イソオイゲノール混合物 (2.0 : 28.0 : 70.0 wt/wt) を分析した結果を **Table-1** に示した。

1) カラムの調製

担体, ダイヤベース A 50~70 mesh 20 g をすり合せつき 100 ml のナス型フラスコにとり, これに固定相液体 4 g を溶解したアセトン, メタノール, あるいはベンゼン溶液 50 ml を加え, 常圧蒸留により溶剤を除き, さらに沸騰水浴中でアスピレーターの減圧下に加熱し溶剤

Table-1 The analytical results of a mixture of eugenol, *cis*- and *trans*-isoeugenol by GLC with the thermal conductivity detector. The gas chromatograms in **Fig.-1** No. 1~6.

No.	Column tube	Liquid phase	Coated on	Coating	He pressure flow rate	Temperature (°C)		Analytical results
1	Stainless tube 5.5 mm×2 m	D.C. 5.50(17%) +D.O.S. (3%) mixed	Diabase A 50~70 mesh	Single coated	0.9 kg/cm ² 60 ml/min	Column 200	Split 300	◎**
2	"	D.C. 550(20%)	"	"	"	"	"	×
3	"	Apiezone L (20%)	"	"	"	"	"	×
4	"	1) D.C. 550(10%) 2) D.O.S. (10%)	"	Double coated	"	"	"	×
5	Copper tube 4.5 mm×2 m	1) D.C. 550(5%) 2) P.E.G. 4000(5%) 3) P.E.G. 1500(10%)	"	Triple coated	0.96 kg/cm ² 40 ml/min	215	"	×
6	Stainless tube 5.5 mm×2 m	1) D.C. 550(17%) 2) D.B.P. (3%)	"	Double coated	0.9 kg/cm ² 60 ml/min	300	"	×

* Paper feed : 0.5 cm/min, Filament current : 80 mA, Record sensibility : 4 mV.

** ◎ good resolution, × poor resolution.

を除く。このようにして得られた充テン物を径 5.5 mm, 長さ 2 m のステンレス製細管(実験番号 5 では径 4.5 mm, 長さ 2 m の銅製細管)にパイプレーターを用い充てんした。実験番号 1 では固定相液体としてシリコン D.C. 550 3.4 g と D.O.S. 0.6 g の混合物をアセトンに溶かした溶液 50 ml を用いた。実験番号 2, 3 ではシリコン D.C. 550 4 g を含む 50 ml のアセトン溶液, アピエゾン L 4 g を含むベンゼン溶液 50 ml をそれぞれ固定相液体溶液として用いた。実験番号 4 においてはシリコン D.C. 550 2 g を含むアセトン溶液 50 ml で担体を処理したのち, さらに D.O.S. 2 g を含むアセトン溶液 50 ml で処理した。実験番号 5 ではシリコン D.C. 550 1 g を含むアセトン溶液 50 ml P.E.G. 4000 1 g を含むメタノール溶液 50 ml, さらに P.E.G. 1500 2 g を含むメタノール溶液 50 ml で順次 3 回繰り返して処理を行なった。実験番号 6 では, 担体をシリコン D.C. 550 3.4 g を含むアセトン溶液 50 ml で処理したのち, さらに D.B.P. 0.6 g を含むアセトン溶液 50 ml で処理した。

2) オイゲノール, シス-およびトランス-イソオイゲノール混合物のガスクロマトグラフィー

上記カラムを用いて **Table-1** で示した測定条件の下で得たオイゲノール, シス- およびトランス-イソオイゲノール混合物のガスクロマトグラムを **Fig.-1** に示す。

Fig.-1 から明らかなように, 実験番号 3 (アピエゾン L カラム) では分離が不良であり, 実験番号 2, 4, 5, 6 ではいずれもガスクロマトグラムのピークはテーリングを

Fig.-1 The gas chromatograms of a mixture of eugenol, *cis*- and *trans*-isoeugenol using various liquid substrates.

伴った。しかし, 実験番号 1 のシリコン D.C. 550-D.O.S. 混合固定液相カラムは最も良い分離を示した。したがって以下の実験においては実験番号 1 の測定条件下で測定を行なった。

2.3 内部標準物質の選択

分析の精度, および実用性の点で内部標準物質としての性質にはガスクロマトグラムにおけるピークがオイゲノールおよびイソオイゲノールのそれと充分分離できかつこれらの物質の保持時間が比較的近いことが重要である。これらの点を考え, つぎの 24 種の化合物について検討を行なった。実験条件は **Table-1**, 実験番号 1 によった。

検討した内部標準物質(カッコ内は bp °C/760 mmHg)をつぎに示す。パラクレブゾール (199), メントール (216), カルボン (230), シトロネロール (224), ドデシルアルコール (225), メチルフェニルグリシド酸エチル (200), ノニルアルコール (213.5), ヒドロキシシトロネロール (116/5 mmHg), ベンジルアルコール (204.5), *γ*-ノニルラクトン (136/13 mmHg), *γ*-ウンデカラクトン (285), メチルオイゲノール (244), エチルバニリン (280), フェニルグリシド酸エチル (275), フタル酸ジメチル (298), クマリン (302), バニリン (285), 安息香酸ベンジル (325), ケイ皮酸メチル (259), サリチル酸イソアミル (276), アセチルオイゲノール (281), ケイ皮酸イソプロピル (268), ケイ皮酸-*n*-ブチル (288), ケイ皮酸-*n*-プロピル (283)。その結果カルボン, フタル酸ジエチル, アセチルオイゲノール, ケイ皮酸-*n*-プロピルなどが試料とは保持時間を異にする分離良好なピークを与えた。ほかはすべてオイゲノール, イソオイゲノールのいずれかのピークに重なった。しかし, オイゲノール, イソオイゲノールより保持時間の短いカルボンを内部標準物質に用いると, カルボンの混合重量比を試料 1 に対し 0.3 以上用いたガスクロマトグラムではカルボンの示すピークがスケールアウトしやすかった。アセチルオイゲノールの保持時間は分析試料とは明らかに異なっているが, これを内部標準物質に用いると分析工程中でイソオイゲノールとの間にアセチル基の移動を行ない, **Fig.-2** に示したように, 本実験の条件の下では約 4% のアセチルイソオイゲノールの生成が認められ, 内部標準物質としては適当でないことがわかった。しかしフタル酸ジエチルとケイ皮酸-*n*-プロピルを用いた際にはこのようなことは認められず内部標準物質としてすぐれていることがわかった。またこれらの中でフタル酸ジエチルに比べ保持時間が試料のそれに近接しており, かつガスクロマトグラムのテーリングが少ないことなどからケイ皮酸-*n*-プロピルが最も適当な内部標準物質であると結論した。つぎにこれらの内部標準物質-試料系のガスクロマトグラムの数例を **Fig.-2** に示す。

Fig.-2 The gas chromatograms of a mixture of eugenol, *cis*- and *trans*-isoeugenol and an inner standard material.

Fig.-3 Calibration curve of eugenol, *cis*- and *trans*-isoeugenol reference to *n*-propyl cinnamate.

Table-2 Quantitative analysis of a mixture* of eugenol, *cis*- and *trans*-isoeugenol by GLC with the thermal conductivity detector. Analytical condition was same that of in Table-1.

Component	Calc. %	Obs. %	$\bar{x}$	$\hat{\sigma}$	<i>s</i>
Eugenol	29.8	29.0~31.8	30.5	0.9	0.8
<i>cis</i> -Isoeugenol	33.8	31.8~34.4	33.1	0.9	0.8
<i>trans</i> -Isoeugenol	36.4	32.4~36.8	34.8	1.5	1.4

Inner standard material; *n*-propyl cinnamate.

* The sample used was a mixture of eugenol, *cis*-isoeugenol, *trans*-isoeugenol and *n*-propyl cinnamate (22.3 : 24.1 : 26.7 : 26.9 wt/wt).

2・4 オイゲノール、シス-およびトランス-イソオイゲノールのケイ皮酸-*n*-プロピルに対する検量線の作成

分析を行なった条件 (測定条件, Table-1 の実験番号 1) の下では, オイゲノール, シス-およびトランス-イソオイゲノールなどの純物質のガスクロマトグラムには, それぞれ一つのピークしか観測されなかった。そこでケイ皮酸-*n*-プロピルを内部標準物質としてオイゲノール, シス-およびトランス-イソ

オイゲノール混合物を分析する際に必要である検量線 (Fig.-3) を求めた。その結果, Fig.-3 に示したように, 内部標準物質を基準としたときの純物質との面積比と混合重量比は直線関係にあることがわかった。

2・5 オイゲノール, シス-およびトランス-イソオイゲノール混合試料の定量

ケイ皮酸-*n*-プロピルを内部標準物質としてオイゲノール, シス-イソオイゲノール, トランス-イソオイゲノールの混合試料 (29.8 : 33.8 : 36.4 wt/wt) について 10 回測定し分析精度を調べた (Table-2)。その結果 $\pm 1.5\%$ のばらつき範囲内でオイゲノール, シス-およびトランス-イソオイゲノールの混合物が定量可能であることがわかった。また, シス-イソオイゲノール単体のガスクロマトグラムが単一のピークしか示さないことからこれらの分析工程中でシス-イソオイゲノールのトランス-イソオイゲノールへの異性化反応は行なわれていないものと考えられる。

(昭和 42 年 2 月 16 日受理)

文 献

- 1) Y.R. Naves, *Bull. Soc. Chim. France.*, 1233 (1959)
- 2) 平尾 “有機化合物合成法” VI, 69-73 (1953), 有機合成化学協会編, 技報堂
- 3) F.R. Boedecker, *Ber.*, **64**, 61 (1931)
- 4) P.Z. Bedoukian, *Perf. Synth. and Isol.*, 199 (1951). D. Van Nostrand Company, Inc., New York
- 5) E. Fischer, *Bre.*, **28**, 3254 (1895)