過ヨウ素酸酸化法を利用した Guaiacol Glyceryl Ether の Gas Chromatography

小林恵子,^{*,a} 岡本光美,^b 河合 聡^a

岐阜薬科大学,^a 岐阜県衛生研究所^b

Gas Chromatographic Determination of Guaiacol Glyceryl Ether using Periodate Oxidation Method

KEIKO KOBAYASHI,^{*,a} MITSUYOSHI OKAMOTO,^b and SATOSHI KAWAI^a

Gifu College of Pharmacy,^a 6-1, Mitahora-higashi, 5-chome, Gifu 502, Japan

and Gifu Prefectural Institute of Public Health,^b

6-3, Noishiki 4-chome, Gifu 500, Japan

(Received May 22, 1982)

Pentafluorobenzoyloxylamine hydrochloride (PFBOA) is an excellent reagent used for the syntheses of some derivatives in gas chromatography of water-soluble low molecular weight carbonyl compounds. To a sample solution (3.0 ml) containing 5—50 μ g of guaiacol glyceryl ether (GGE) 0.5 ml of 0.01 M NaIO₄ was added and the solution was oxidized on standing at room temperature for 10 minutes. After decomposing excess NaIO₄ by 0.1 N Na₂S₂O₃, HCHO produced reacted with 0.5 ml of PFBOA aqueous solution (40 mg/ml) on standing at room temperature for 60 minutes. One drop of 18 N sulfuric acid saturated with sodium chloride was further added to this solution, which was extracted with 0.3 ml of hexane containing an internal standard (IS) and applied to gas chromatography. Indobenzene (30 μ g/ml) and allethrin (25 μ g/ml) were well suited as internal standards for the determination of HCHO and methoxyphenoxycetaldehyde (MPA), respectively, which were both synthesized by the oxidative reaction. Gas chromatography was carried out on a glass column of 3% XE-60, 2.0 m, FID and the column temperatures for HCHO and MPA were 80°C and 190°C, respectively.

Keywords—pentafluorobenzoyloxylamine; gas chromatography; guaiacol glyceryl ether; periodate oxidation

Guaiacol glyceryl ether (GGE) は鎮咳剤として広く用いられている。その分析法としては gas chromatography (GC),¹⁾ colorimetry,²⁾ high-performance liquid chromatography,^{3,4)} などが報告されている。著者らは含フッ素カルボニル試薬である pentafluorobenzoyloxylamine hydrochloride (PFBOA) が水溶性低分子カルボニル化合物の GC における誘導体化試薬としてすぐれた性質を有することを明らかにし,^{5,6)} 衣類中の遊離 HCHO,⁷⁾ amygdalin⁸⁾ や H₂O₂⁹⁾ の GC に応用してきた。PFBOA の多面的な応用研究の一環として今回は水溶液中の微量 GGE を過ヨウ素酸酸化して生成する HCHO および 2-methoxyphenoxycetaldehyde (MPA) を PFBOA と縮合させ GC で測定する方法について基礎的な検討を加えた。

実 験 の 部

I) 試料, 試薬 Guaiacol glyceryl ether (GGE, 東京化成), PFBOA は pentafluorobenzyl bromide (Aldrich) と N-hydroxyphthalimide (東京化成) とより合成,⁵⁾ チオ硫酸ナトリウム (和光純薬), 内部標準物質 (IS): HCHO の測定には iodobenzene のヘキサン溶液 (30 μ g/ml) を, MPA の測定には allethrin のヘキサン溶液 (25 μ g/ml) を用いた。

II) 装置および GC 条件 1) 装置—島津 GC-4BPF (水素炎イオン化検出器, FID)。

2) GC 条件—カラム: 3% XE-60, 2.0 m×3 mm I.D., カラム温度: HCHO の測定には 80°C, MPA の測定には 190°C, キャリヤガス: 窒素 (45 ml/min)。

III) 定量法 GGE を含む試料溶液 3.0 ml に 0.01 M NaIO₄ 0.5 ml を加え, 室温で 10 分放置する。0.1 N Na₂S₂O₃ 0.30 ml と 0.1 M NaH₂PO₄ 1.0 ml を加えた後 PFBOA 水溶液 (40 mg/ml) 0.5 ml を加えて室温で 60 分

放置する。次に NaCl を飽和させ、18 N H₂SO₄ 1 滴を加え、IS を含むヘキサン溶液 0.3 ml で抽出し GC で測定する。

結果および考察

GGE を過ヨウ素酸酸化すると HCHO と MPA を生成する (Chart 1)。酸化条件は井上らの報告²⁾を参考に設定した。0.01 M NaIO₄ の添加量は 25 μg の GGE に対して 0.15 ml 以上で一定値を示した (Fig. 1)。酸化反応は続く PFBOA との縮合反応も考慮して pH 5.0 前後で行ったが、pH 3—6 の間で変化はみられなかった (Fig. 2)。また酸化反応時間は室温 10 分で一定値を示した。過ヨウ素酸酸化後、過剰の酸化剤を消去するため 0.1 N Na₂S₂O₃ を加えたが、この際井上らの方法に従って反応溶液を強酸性とすると Na₂S₂O₃ の添加量の増大に伴い、アルデヒドの測定値が徐々に低下する現象が観察された。とくに GGE の濃度が小さくなるにつれて測定値のバラツキは大きくなった。その理由は、Na₂S₂O₃ が強酸性下で分解して生成する H₂SO₃ がアルデヒド類と縮合反応 (例えば、HCHO + H₂SO₃ → HCH(OH)SO₃H) を起こすためと推測された。そこで反応溶液に塩酸を加えず、Na₂S₂O₃ の添加量も NaIO₄ の還元分解に必要な最少限に止めることによって安定した測定値が得られた。その後の操作中 I₂ の還元によって抽出溶液が着色する現象がときにみられたが測定に支障はなかった。

HCHO および MPA と PFBOA との縮合反応は弱酸性 (pH 3—6) で容易に進行し、生成した縮合体はヘキサンに抽出され、同一抽出液についてカラム温度を変えることによって両成分の GC による測定が可能であった。その分離例が Fig. 3A, 3B である。IS として HCHO の測定には iodobenzene を用いた。検量線は試料溶液 0.5 ml 中 GGE の 5—50 μg の濃度範囲で相関係数 0.9996 ときわめて良好な結果を示した。MPA の測定には IS と

Chart 1. Periodate Oxidation of Guaiacol Glyceryl Ether (GGE), and Derivatization of HCHO and 2-Methoxyphenoxylacetaldehyde (MPA) with Pentafluorobenzylamine Hydrochloride (PFBOA)

Fig. 1. Effect of Periodate Concentration (○—○ HCHO-PFBOA, ●—● MPA-PFBOA)

Fig. 2. Effect of pH on Periodate Oxidation (○—○ HCHO-PFBOA, ●—● MPA-PFBOA) and Effect of pH on Condensation with PFBOA (□—□ HCHO-PFBOA, ■—■ MPA-PFBOA)

Fig. 3. Gas Chromatograms of Pentafluorobenzoyloximes of HCHO (3A) and MPA (3B) produced from Periodate Oxidation of GGE

1) HCHO-PFBOA, 2) iodobenzene (IS), 3) MPA-PFBOA, 4) allethrin (IS).
GC conditions-column; 3% XE-60, 80—100 mesh, 2.0 m×3 mm I.D., column temp.; 80°C (3A) and 190°C (3B), carrier gas; N₂ 45 ml/min, detector; FID.

Fig. 4. GC-MS of Peak 3 in Fig. 3B

して allethrin が適当であった。MPA は標品が入手できなかったため既知濃度の GGE 溶液について同一操作を加えて作成した working curve を利用して定量を行った。クロマトグラム上のピークが MPA と PFBOA の縮合体 (MW=361) であることは GC-MS で確認された (Fig. 4)。

Fig. 3B のピークが2つに分裂しているのは *syn*-, *anti*- の異性体起因する。両者のピーク比は加えられた PFBOA 濃度によってやや変動したが、本定量条件の下ではいずれのピークを利用した検量線も原点を通る直線性を示した。しかし GGE の 5—50 μg の濃度範囲での相関係数は 0.9993 という値が得られ、HCHO の測定に比べ、やや大きいバラツキを示した。

本法は HCHO に対してきわめて安定した測定値が得られたが、共存糖の影響をうけるという欠点があった。例えば 25 μg の GGE に対する測定値を 100% としたとき、グルコースの共存が測定値に及ぼす影響 (%) で示すと、30 μg (108%), 100 μg (121%), 200 μg (171%), 500 μg (208%) であった。そこで、過ヨウ素酸酸化によって GGE から特異的に生成する MPA の測定に着目し、共存グルコースの妨害を除くことを考えた。検討の結果、500 μg (101%) (*n*=3) の測定値が得られ、500 μg のグルコース共存条件での検量線は 5—50 μg の GGE 濃度範囲で相関係数 0.9939 を示し、同一条件での 25 μg GGE のくりかえし測定値は CV=2.38% (*n*=5) と良好な結果を示した。

以上の結果より、過ヨウ素酸酸化により生成したカルボニル化合物の GC においても PFBOA はすぐれた誘導体化試薬として利用できることが明らかとなった。GGE の場合、酸化反応で生成する HCHO と MPA のいずれの成分をも GC 測定の対象とすることが可能であったが、HCHO を測定する方が鋭い単一ピークを示すこと、低い温度での GC 測定が可能であること、測定値のバラツキが小さいこと、などの点ですぐれていた。また、グルコースの共存は HCHO の測定値に大きな影響を与えたが、この影響は MPA を測定することによって解決された。GGE は水溶性であり定量的な有機溶媒抽出は困難であるが、本法は血中 GGE の濃度測定などに充分実用性があると考えられる。

引用文献

- 1) 服部哲靖, 河合 聡, 西海 里, 分析化学, **14**, 586 (1965).
- 2) 井上哲男, 立沢政義, 中込 誠, 薬剤学, **30**, 77 (1970).
- 3) 立沢政義, 橋場茂子, 江島 昭, 衛生化学, **23**, 282 (1977).
- 4) 立沢政義, 松田りえ子, 山宮卓二, 江島 昭, 衛生化学, **25**, 279 (1979).

-
- 5) K. Kobayashi, M. Tanaka, S. Kawai, *J. Chromatogr.*, **187**, 413 (1980).
 - 6) K. Kobayashi, E. Fukui, M. Tanaka, S. Kawai, *J. Chromatogr.*, **202**, 93 (1980).
 - 7) 小林恵子, 岡本光美, 河合 聡, 分析化学, **30**, 76 (1981).
 - 8) S. Kawai, K. Kobayashi, Y. Takayama, *J. Chromatogr.*, **210**, 342 (1981).
 - 9) K. Kobayashi, S. Kawai, *J. Chromatogr.*, **245**, 339 (1982).