

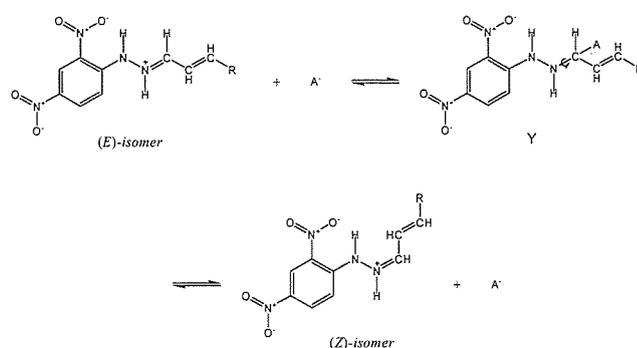
Table 3. The maximum Z/E isomer ratios achieved for various hydrazone derivatives

derivatives	Z/E	derivatives	Z/E
2C3-D	0.018	4C5-D	0.14
T2C4-D	0.035	T4C10-D	0.21
T2C5-D	0.035	C4C10-D	0.13
T2C6 -D	0.035	C7C10-D	0.15
T2C7-D	0.035		
T2C8-D	0.035		
T2C9 -D	0.036		
T2C10-D	0.036		

T2C5-D の場合、0.005% のリン酸濃度では僅かな異性化しか観測されなかった。しかし、リン酸濃度の増加とともに急激に異性体比が大きくなり、一定の異性体比 (0.035) に達し平衡状態になった。107 時間後では、幅広いリン酸濃度 (0.002~1%) で平衡状態に達した。他の 2-アルケナール-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体も T2C5-D と同様の曲線が得られた。4C5-D の場合は T2C5-D のときよりも、さらに低いリン酸濃度 (0.0001%) で異性化が観測された。そして、T2C5-D と同様に、リン酸濃度の増加とともに急激に異性体比が大きくなり、一定の異性体比 (0.14) に達して平衡状態に至った。リン酸濃度が 0.5~1.0% を超えると異性体比が 0.14 より高くなったが、このときのクロマトグラムは歪んでしまったため正確な異性体比を表していない。他の、4-アルケナール、7-アルケナール-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体も同様の曲線が得られた。4C5-D の異性化速度は、全てのリン酸濃度で T2C5-D より速く平衡状態に達し、アルケナール-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の異性体比と同じ値であった³³⁾。

酸性溶液では、プロトネートしたアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン

誘導体は次の反応により異性化することが推測される。



プロトネートした *E*-異性体にリン酸等の求核試薬が付加することにより、異性化が起こり *Z*-異性体が生成する²⁴⁾。そのため、異性化速度と平衡異性体比はアルケナールの二重結合の位置に依存することが推測される。C=N 二重結合と共役な C=C 二重結合を持つアルケナール-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体は、他のアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体に比べ異性化速度が遅く平衡異性体比も小さい。そして、共役二重結合の多いベンズアルデヒド類の 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体は、非常に小さい異性体比を示した。例えば、ベンズアルデヒド、*o*-トルアルデヒド、*m*-トルアルデヒド、*p*-トルアルデヒド、2,5-ジメチルベンズアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の平衡異性体比は、それぞれ 0.0011, 0.0039, 0.00096, 0.0011, 0.0041 であった。

C. 結論

純粋なアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体は *E*-異性体しか存在しないが、少量の酸を添加することで異性化が進行し *Z*-異性体を生成する。そして、異性体比 *Z/E* は幅広い酸濃度で平衡状態に達した。また、これらの *E*-、*Z*-異性

体は、それぞれ極大吸収波長やモル吸光係数が異なった。

一般に空気中のアルデヒド類の分析にはDNPH-カートリッジが使用されているが、DNPH-カートリッジには必ず触媒としてリン酸等の酸が含まれている。したがって、捕集を終えたDNPH-カートリッジをアセトニトリル等の溶媒で抽出すると、抽出液には必然的に酸が含まれる。その結果、必ず試料溶液中のアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体にはE-, Z-異性体の両方が存在する。HPLC分析において、酸を含まない標準溶液はE-異性体しか存在せず、これを標準とすると大きな分析誤差を生じる。したがって、標準試料に酸を添加し、異性体比を試料溶液と同一にしてから、HPLCで分析すべきである。

D. 文 献

- 1) Allen, C. F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 2955-2959.
- 2) Brady, O. L. *J. Chem. Soc.* **1931**, 756-759.
- 3) Grosjean, D. *Environ. Sci. Technol.* **1982**, *16*, 254-262.
- 4) Andersson, G., Andersson, K., Nilsson, C. A., Levin, J. O. *Chemosphere*, **1979**, *8*, 823.
- 5) Andersson, K., Hallgren, C., Levin, J. O., Nilsson, C. A., *Chemosphere*, **1981**, *10*, 275.
- 6) Beasley, R. K., Hoffmann, C. E., Rueppel, M. L., Worley, J. W. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1110-1114.
- 7) Guenier, J. P., Simon, P., Delcourt, J., Didierjean, M. F., Lefevre, C., Muller, J. *Chromatographia*, **1984**, *18*, 137-144.
- 8) Grosjean, D. Fung, K. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1221-1224.
- 9) Kuwata, K., Uebori, M., Yamasaki, H., Kuge, Y., Kiso, Y. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 2013-2016.
- 10) Lipari, F., Swarin, S. J. *Environ. Sci. Technol.* **1985**, *19*, 70-74.
- 11) Levin, J. O., Andersson, K., Lindahl, R., Nilsson, C. A. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1032-1035.
- 12) Method for the determination of formaldehyde in ambient air using adsorbent cartridge followed by high performance liquid chromatography (HPLC); 1998; U. S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development; Research Triangle Park, NC; Compendium method TO-11.
- 13) Uchiyama, S.; Hasegawa, S. *Atmos. Environ.* **1999**, *33*, 1999-2005.
- 14) Arnts, R.R.; Tejada, S.B. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, *23*, 1428-1430.
- 15) Smith, D.F.; Kleindienst, T. E.; Hudgens, E.E. *J. Chromatogr.* **1989**, *483*, 431-436.
- 16) Rodier, D.R.; Nondek, L.; Birks, J.W. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2814-2820.
- 17) Karst, U.; Binding, N.; Cammann, K.; Witting, U. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, *345*, 48-52.
- 19) Ramirez, F.; Kirby, A. F. *J. Amer. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1037-1044.
- 20) Behforouz, M.; Bolan, J. L.; Flynt, M. S. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1186-1189.
- 22) Tayyari, S. F.; Speakman, J. L.; Arnold, M. B.; Cai, W.; Behforouz, M.

- J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 2195-2200.
- 23) Kallury, K.; Shieh, P.; Paschal, R.; Cooke, N. *Supelco Rep.* **1998**, *17*, 5-7.
- 24) Karabatsos, G.J.; Vane, F.M.; Taller, R.A.; Hsi, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 3351-3357.
- 25) Uchiyama, S., Ando, M., Aoyagi, S. *J. Chromatogr. A* **2003**, *996*, 95-102.
- 26) Tamura, H., Shibamoto, T. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *248*, 619-623.
- 27) Yasuhara, A., Dennis, K.J., Shibamoto, T. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1989**, *72*, 749-751.
- 28) Uchiyama, S.; Aoyagi, S.; Ando, M. *Atmos. Environ.* **2004**, *38*, 6319-6326.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Ⅱ－１．３．カルボン酸とアルデヒド・ケトン類の同時分析

分担研究者 大坪 泰文 千葉大学 工学部 教授

内山 茂久 千葉大学 工学部 非常勤講師

協力研究者 松島江里香 国立医薬品食品衛生研究所

環境衛生化学部 協力研究員

研究要旨 カルボン酸とアルデヒド、ケトン類を同時に分析する方法を開発した。本研究の最も重要な発見は、カルボン酸が 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンと反応し、安定なヒドラジド誘導体を生成することである。このヒドラジド誘導体は、対応するヒドラゾン誘導体より 32～50℃程度融点が高く熱安定性に優れていた。また、C₁～C₄カルボン酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体は 331～334 nm の極大吸収波長と 1.4×10⁴ L/mol/cm の比較的大きいモル吸光係数を示したことから、HPLC-UV で検出することが可能である。RP-AmideC16, Ascentis RP-Amide などのアミド系のカラムを用いることで、C₁～C₄ のカルボン酸、アルデヒド類を完全に分離することができた。大気の捕集には 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 含浸シリカを充填したカートリッジを使用した。大気中のカルボン酸は完全にカートリッジに吸着するが、DNPH との反応は非常に遅い。しかし、捕集後のカートリッジを 80℃で 4 時間加熱することで、未反応のカルボン酸は全てヒドラジド誘導体に変化した。このヒドラジド誘導体はヒドラゾン誘導体と共にアセトニトリルで抽出できる。試料空気を 100ml/min の流速で 24 時間吸引した場合、LOD は 0.4 ug/m³であった。

A. 研究目的

カルボン酸類、アルデヒド類、ケトン類などのカルボニル化合物は対流圏に偏在する物質であり、多くの分析方法が報告されている。カルボン酸分析の最初の報告は、“バブラーを用いた水酸化ナトリウム水溶液捕集—シリカゲルカラムクロマトグラフィー滴定¹⁾”である。その後、多くの分析法が開発されたが、空気中のカルボン酸を捕集する媒体としては、水²⁾や水酸化ナトリウム水溶液³⁾などの液体を用いるものが多い。また、水酸化カリウム⁴⁾や炭酸ナトリウム⁵⁾を含浸させたろ紙、シリカゲル⁶⁾や水

酸化カリウム含浸 C18⁷⁾を充填したカートリッジなども使用されている。この他、ガスと粒子の拡散係数の大きな差を利用した拡散デニューダー^{8,9)}も空気中カルボン酸の捕集に利用されている。抽出溶液の分析には、イオンクロマトグラフィー¹⁰⁾、イオン排除クロマトグラフィー¹¹⁾、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)¹²⁾、キャピラリー電気泳動¹³⁾、ガスクロマトグラフィー (GC)⁴⁾、SPME-GC/MS¹⁴⁾など多くの方法が使用されている。

アルデヒド、ケトン類の分析として最も広く利用されているのは、アミノ基(NH₂)

を持つ化合物のカルボニル(C=O)炭素への求核付加反応，及び安定なシッフ塩基(C=N)生成反応である。この誘導体化法はGCやHPLCにおいて非常に有用であり，O-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン¹⁵⁾，O-ベンジルヒドロキシルアミン¹⁶⁾，2-ジフェニルアセチル-1,3-インダンジオン-1-ヒドラジン¹⁷⁾，5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホヒドラジン(ダンシルヒドラジン)¹⁸⁾，N-メチル-4-ヒドラジノ-7-ニトロベンゾフラザン¹⁹⁾，ペンタフルオロフェニルヒドラジン²⁰⁾，2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)²¹⁻²³⁾などの多くの誘導体化試薬が使用されている。特に，DNPHとアルデヒド，ケトン類の反応は80年近く前から研究されている^{24,25)}。アルデヒド，ケトン類のDNPH誘導体は360 nm付近に極大吸収波長をもつため，UV検出器を備えたHPLCで分析されることが多い^{26,27)}。近年，DNPH-HPLC法は大気中のカルボニル化合物の分析方法として最も広く利用されている。食品，生体試料，液体試料中のカルボン酸，アルデヒド，ケトン類の分析において，2-ニトロフェニルヒドラジンによる誘導体化法が広く使用されている^{28,29)}。しかし，この方法は脱水縮合剤としてDCC，触媒としてアニリンを使用し，操作が煩雑であるばかりではなく，空気試料に応用することは困難である。

以上のように，カルボン酸，アルデヒド，ケトン類の分析方法は非常に多くの種類があるが，大気中の同時分析を行った報告は全く無い。しかし，アルデヒドからカルボン酸への酸化反応は，大気光化学反応を解明する上でも重要であり，分析値の整合性を計る上でも同時分析が好ましい。本研究では，C1～C4のカルボン酸，アルデヒド，ケトン類をDNPHと反応させ同時分析する新しい手法を開発した。

B. 研究方法

装置：HPLCは2台の送液ポンプLC-10ADvp，オートサンプラーSIL-10Advp，紫外検出器SPD-10Avp，フォトダイオードアレイ検出器SPD-M10Avpを備えたLC-10(島津製作所製)を使用した。分離カラムはDiscovery RP-Amide C16(250 mm L×4.6 mm i.d. 5µm particle size, スペルコ社製)を用いた。送液は移動相A:アセトニトリル/水，40/60 v/v，移動相B:アセトニトリル/水，60/40 v/vを用い，下記のグラジエントプログラムで2液グラジエント分析を行った。

Time (min)	0	8	30	45
A (%)	100	100	0	0

流速は1.5 mL/minであった。この他，Discovery C18(5µm particle size 250 mm L×4.6 mm i.d., スペルコ社製)も比較のため使用した。

誘導体の融点測定にはQ10示差走査熱量計(DSC, TA Instruments社製)を窒素気流中で使用した。

カルボン酸-DNPH誘導体の同定，構造解析には核磁気共鳴装置(NMR JNM-ECX400, 日本電子社製)を400 MHzで使用した。

試薬：HPLCおよび試薬の調整にはMilli-Q Water Systemを使用した。アセトニトリルはHPLC grade(和光純薬工業製)，ギ酸(96%)，酢酸(99.8%)，プロピオン酸(99.5%)，酪酸(99%)，ホルムアルデヒド(37%水溶液)，アセトアルデヒド(99.5%)，プロピオンアルデヒド(97%)，ブチルアルデヒド(99.5%)，シリカゲル(DavisilTM grade 635, 60-100 mesh)はアルドリッチ社製を使用した。DNPH

(containing approx. 50% water) とリン酸(>85%)は和光純薬工業製、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩は関東化学社製を使用した。

1. カルボン酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の合成

ギ酸-DNPH 誘導体：5 g の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩を 50 ml のギ酸に溶かす。純水 50 ml をこの溶液に加えた後 2 時間放置する。生成した淡黄色の沈殿をろ過して、残渣を純水 500 ml で洗浄する。沈殿をエタノールで再結晶させた後、真空乾燥した。

酢酸，プロピオン酸，酪酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の合成：

5 g の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩と 5 mL の硫酸をそれぞれのカルボン酸 50 mL に溶かす。室温で 24 時間静置した後、沈殿をろ過し残渣を純水 500 mL で洗浄する。沈殿をエタノールで再結晶させた後、真空乾燥した。

2. カルボン酸捕集用 DNPH-cartridge の作成

50 g のシリカゲルを 500 mL の純水で 3 回、ついで 500 mL のメタノールで 2 回、最後に 500 mL のアセトニトリルで 2 回洗浄する。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 0.18 g とリン酸 0.5 mL をアセトニトリル 150 mL に溶かす。この溶液に洗浄したシリカゲル (50 g) を加え、よく攪拌する。40 °C に設定したロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ、アセトニトリルを完全に除去する。DNPH 含浸シリカゲル 500 mg をポリエチレン製のカートリッジ (50 mm L× 8.8 mm i.d.) に充填し冷暗所 (4 °C) に保存した。

ギ酸標準ガスの発生と DNPH-cartridge に

よる捕集：

ギ酸の標準ガスはガス発生器 (パーミエーター PD-1B, GASTEC 社製) を用いて発生させた。標準ガス発生器と DNPH-cartridge による捕集の概要を Fig. 1 に示す。

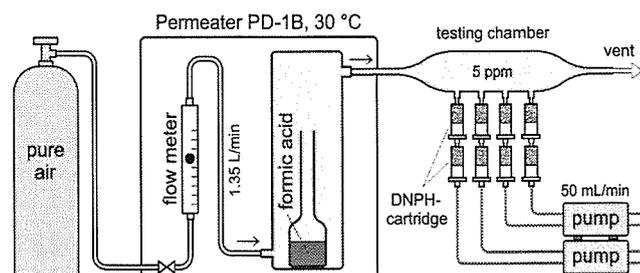


Fig. 1. Schematic diagram for formic acid gas generation and collection by DNPH cartridge.

ディフュージョンチューブ (3 mm i.d.) にギ酸を約 2 mL 加え、30.0 °C に設定したパーミエーターに入れるた後、純空気を一定の流速でパーミエーターに流す。ギ酸標準ガスの濃度は、ディフュージョンチューブの減少したギ酸の重量と導入した純空気の量から計算できる。例えば、ギ酸標準ガスは 30 °C の温度で 1.35 L/min の流速のとき 5 ppm の濃度である。

DNPH-cartridge の一端をチャンバーに接続し、もう一方をマスコントローラーを備えた定流量ポンプ (SP 208 Dual, GL サイエンス社製) に接続した。

C. 研究結果および考察

1. カルボン酸-DNPH 誘導体

ギ酸標準ガスを飽和させた DNPH-cartridge を放置しておくと、DNPH の黄色い色が徐々に淡黄色に変化し、約 6 時間で全てが淡黄色に変わった。この DNPH-cartridge をアセトニトリルで溶出し、HPLC で分析すると DNPH のピークと異なった保持時間にピークが現れた

ことから、DNPH-cartridge 内でギ酸と DNPH が反応したことが推測される。ギ酸標準ガスを飽和させた DNPH-cartridge 内の反応を明らかにするため、DNPH-cartridge 内の DNPH と反応物質の経時変化を測定した (Fig. 2)。

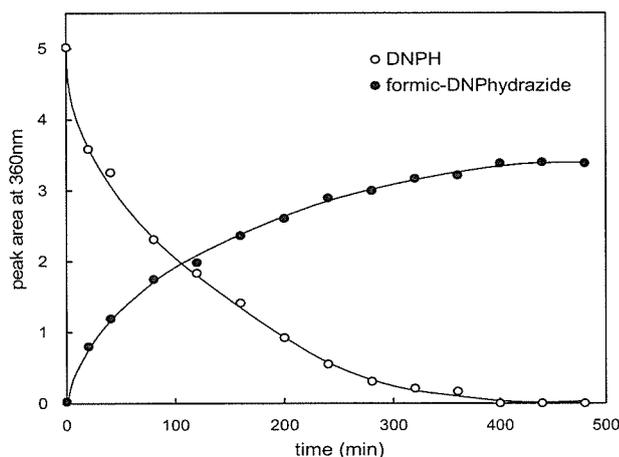


Fig. 2. The reaction of excess formic acid and DNPH with time ($\lambda=360\text{nm}$).

HPLC の検出波長は 360 nm である。DNPH の減少に伴い未知物が増加した。反応時間と共にこのピークの物質は増加し、最終的に DNPH は消滅した (Fig. 2)。酢酸、プロピオン酸、酪酸も同様な挙動を示したが、炭素数の増加に伴い反応時間も長くなった。カルボン酸と DNPH の反応としては、まずヒドラゾン誘導体が生成し、ケト-エノール互変異性化によりヒドラジド誘導体が生成したことが推測できる。

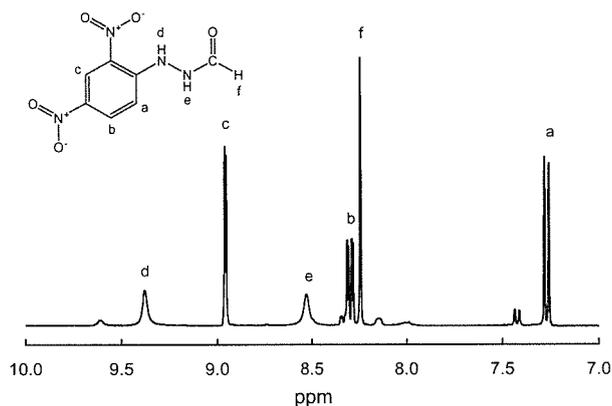
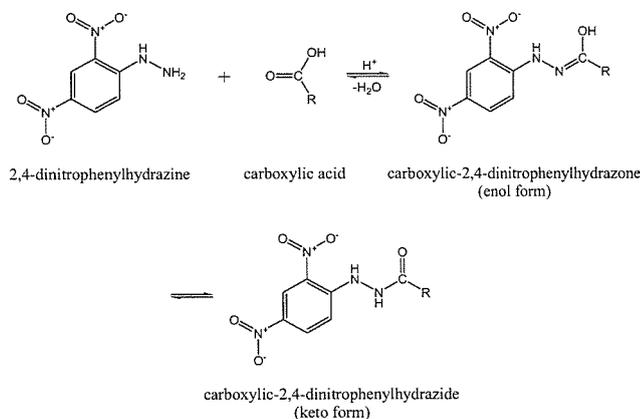


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the DNPH derivative synthesized with formic acid.

DNPH-cartridge から溶出した物質と本実験で合成した誘導体を 2 種類のカラム (C18 and RP-Amide C16) で HPLC 分析すると、保持時間が同一であったことから、これらの物質は同じ誘導体であることが確認された。

2. カルボン酸-DNPH 誘導体

本実験で合成したカルボン酸-DNPH 誘導体を NMR で測定した。ギ酸-DNPH 誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 3 に示す。また、バカボン酸-DNPH の $^1\text{H-NMR}$ データは以下の通りである。

formic-DNPH: $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$, $\delta(\text{ppm})$: 7.25 (d 1H, $J=9.6$, a); 8.28 (dd 1H, $J=2.5, 9.4$, b); 8.94 (d 1H, $J=2.8$, c); 9.36 (s 1H, d); 8.49 (s 1H, e); 8.23 (s 1H, f).
 acetic-DNPH: $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$, $\delta(\text{ppm})$: 7.25(d 1H, $J=9.2$, a); 8.25 (dd 1H, $J=2.75, 9.6$, b); 8.92 (d 1H, $J=2.8$, c); 9.37 (s 1H, d); 8.49 (s 1H, e); 2.02 (s, 3H, CH_3).
 propionic-DNPhydrazide $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$, $\delta(\text{ppm})$: 7.22 (d 1H, $J=9.6$, a); 8.23 (dd 1H, $J=2.52, 9.39$, b); 8.91 (d 1H, $J=2.29$, c); 9.37 (s 1H, d); 8.48 (s 1H, e); 2.30 (t, 2H, CH_2); 1.13 (t, 3H, CH_3).
 butyric-DNPhydrazide $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN}, \text{TMS})$, $\delta(\text{ppm})$: 7.21 (d 1H, $J=9.15$, a); 8.24 (dd 1H, $J=2.75, 9.62$, b);

8.91 (d 1H, J=2.75, c); 9.39 (s 1H, d); 8.49 (s 1H, e); 2.27 (m, 2H, J=7.56, CH₂); 1.66 (t, 2H, J=7.42, CH₂). 0.964 (t, 3H, J=7.327, CH₃)

DSC 分析の結果, カルボン酸-DNPH 誘導体は熱安定性に優れていることが明らかになった。C₁~C₄の DNPH 誘導体の融点を Table1 に示す。ヒドラジド誘導体は対応するヒドラゾン誘導体より 32~50°C 融点が高かった。

カルボン酸-DNPH 誘導体の紫外可視吸収スペクトルを Fig4 に示す。誘導体は全て, 20μmol/L のアセトニトリル溶液である。Fig4 には参考として, DNPH の吸収スペクトルも示してある。カルボン酸-DNPH 誘導体のスペクトルは, 類似した吸収を示した。特に酢酸, プロピオン酸, 酪酸ヒドラジド誘導体は 333~334nm 付近に極大吸収波長を示し, モル吸光係数(1.42 × 10⁴ - 1.44 × 10⁴ L/mol/cm)も同程度であった (Table 1)。

Table 1. Maximum absorption wavelengths (λ_{max}) and molar absorption coefficients (ϵ) of C₁-C₄ carboxylic acid and aldehyde-DNPH derivatives. Melting points of aldehyde-2,4-DNPhhydrazones are the literature values.

	λ_{max} (nm)	ϵ (L/mol/cm)	mp (°C)
formic-DNPhhydrazide	331	1.36 × 10 ⁴	185.7
acetic-DNPhhydrazide	333	1.42 × 10 ⁴	201.5
Propionic-DNPhhydrazide	334	1.44 × 10 ⁴	192.0
butyric-DNPhhydrazide	334	1.44 × 10 ⁴	167.1
DNPhhydrazine	351	1.55 × 10 ⁴	ca. 200 ³⁰⁾
formaldehyde-DNPhhydrazone	349	1.91 × 10 ⁴	153-156 ³¹⁾
acetaldehyde-DNPhhydrazone	359	2.10 × 10 ⁴	165-168 ³¹⁾

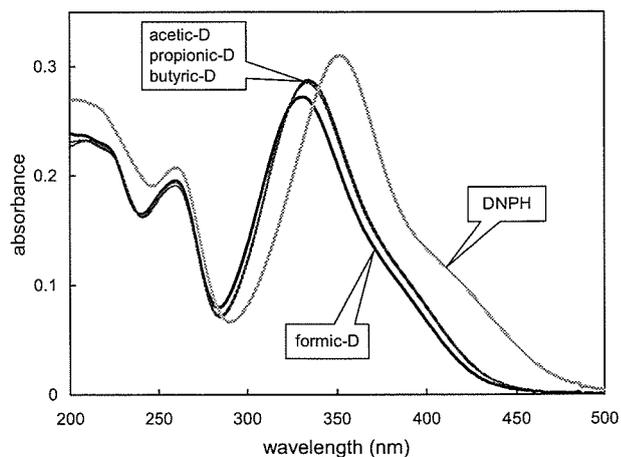


Fig. 4. UV-visible absorption spectra of carboxylic-DNPhhydrazide derivatives in acetonitrile solution (20 μmol/L).

3. カルボン酸 DNPH 誘導体の分離

C18 と RP-Amide-C16 カラムを用いて, 蟻酸, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸-DNPH 誘導体の分析条件を検討した。Fig.5 に RP-Amide-C16 カラムを用いたときの

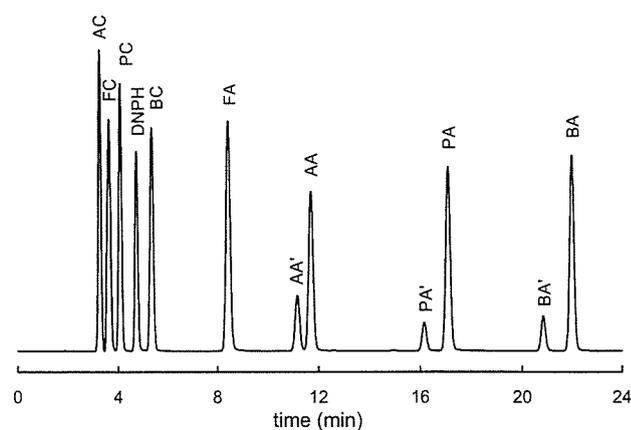


Fig. 5. Chromatographic profile of C₁-C₄ carboxylic-DNPhhydrazides and aldehyde-DNPhhydrazones on RP-Amide C16 column (100 μmol/L). A prime sign indicates the Z-isomer peak and the other peaks without prime sign are the E-isomers.³²

FC: formic-DNPhhydrazide, AC: acetic-DNPhhydrazide, PC: propionic-DNPhhydrazide, BC: butyric-DNPhhydrazide, FA: formaldehyde-DNPhhydrazone, AA: acetaldehyde-DNPhhydrazone, PA: propionalde

C₁~C₄ のヒドラジド, ヒドラゾン誘導体のクロマトグラムを示す。DNPH 誘導体標準溶液の濃度は 100 μmol/L であり, 0.1%のリン酸を含んでいる。アルデヒド-

DNPH 誘導体の場合、小さなピークと大きなピークの2つのピークが検出された。これらは、それぞれ幾何異性体 (Z/E) である³²⁾。アルデヒド-DNPH 誘導体の溶液に酸が含まれないと E-異性体しか存在しないが、求核試薬であるリン酸が存在すると異性化反応が起こり Z-異性体が生成する^{33,34)}。DNPH-cartridge は触媒としてリン酸を含有している。したがって、必然的に抽出溶液に酸が存在し、異性化反応が起こる。これに対し標準溶液には酸が含まれていないので異性化反応は起こらない。試料溶液と標準溶液の異性体比を同一にするために、標準溶液にも 0.1% のリン酸を添加するべきである。Fig. 4 において、ギ酸-、酢酸-、プロピオン酸-DNPH 誘導体のピークは DNPH のピークの前に検出され、酪酸-DNPH 誘導体は後に検出された。分離カラムに C18 を使用した場合、ギ酸-DNPH 誘導体と酢酸-DNPH 誘導体のピークが重なり合い、アセトアルデヒド-DNPH 誘導体の Z-異性体と E-異性体の分離が不完全であった。RP-Amide-C16 などのアミドカラムは高純度シリカをベースにしたアルキルアミド逆相カラムである。アルキルアミド基は、ODS のアルキル基による疎水性親和力に比べ異なった選択性を持つ³⁵⁾。アミドカラムのアルキル基とアルキルアミド基の両方が存在することにより、アルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の極性基とアミド基の間の相互作用、およびアルキル基による疎水性親和力の2つの保持機構が存在する。それゆえ、アミドカラムは ODS と異なった特有の選択性を持ち、従来、分離が困難であったアセトアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの異性体の完全分離が可能になったと思われる。C₂ 以上のアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの場合は、ODS でも必然的に幾何異性体を分離

した。そして、分離させずにシングルピークにすることは不可能であった。ヒドラジド誘導体の場合、アミドカラムを用いることで、C₁~C₄ のカルボン酸-DNPH 誘導体を完全に分離することができた。

4. DNPH-cartridge を用いたギ酸の捕集と誘導体化

2つの DNPH-cartridge を直列に連結し、ギ酸標準ガス (5 ppm) を 50 ml/min の流速で 30 分間通気した。2段目の DNPH-cartridge は1段目を通過したギ酸を捕集するためのバックアップである。捕集後の DNPH-cartridge は 1~10 時間恒温槽内で直ちに加熱された。その後、アセトニトリル 5 mL で DNPH 誘導体を抽出し、HPLC で分析した。各温度におけるギ酸誘導体の経時変化を Fig.6 に示す。全ての実験条件下で、2段目の DNPH-cartridge にギ酸誘導体が検出されなかったことから、1段目で全てのギ酸が捕集されたことが確認された。ガス状のギ酸は DNPH cartridge に非常に速い速度で物理的に吸着する。その後、DNPH と徐々に反応し誘導体が生成したことが推測される。反応速度は 20 °C では非常に遅いが、温度の上昇によって劇的に速くなった。

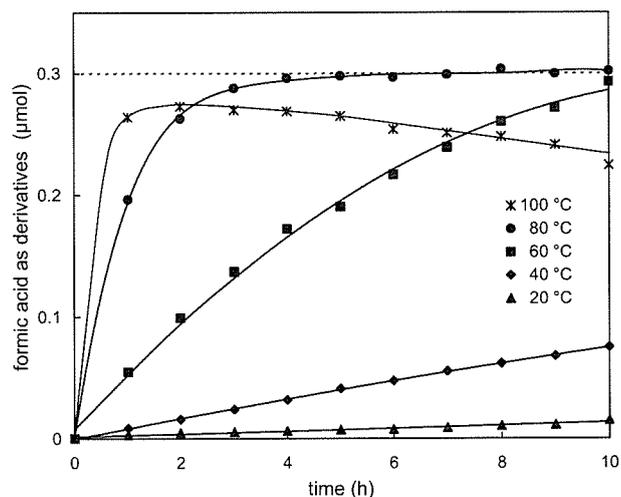


Fig. 6. Reaction of formic acid and DNPH in the DNPH-cartridge at various temperatures.

全ての実験で 100 °C の時が最も反応速度が速かった。しかし、回収率は 100 % (0.3 μmol) に達せず、2 時間を過ぎてから減少し始め、DNPH 誘導体の熱分解が観測された。100 °C に加熱したとき、10 時間で 14 % までに DNPH のピーク面積も減少し、DNPH の分解成分 (1,3-ジニトロベンゼン, 2,4-ジニトロアニリン) が検出された。前述したようにヒドラジド誘導体の熱安定性は非常に高い。しかし、DNPH が熱分解することでギ酸との反応性が低下したことが考えられる。80 °C で 10 時間加熱している間、DNPH のピーク面積は 76 % まで減少した。また、20~60 °C の加熱では、DNPH の分解は認められなかった。以上の結果から、DNPH-cartridge 中でのヒドラジド誘導体化反応の加熱条件は 80 °C 5 時間が最も適していることが明らかになった。

カルボン酸、アルデヒド、ケトン類と DNPH の反応には酸触媒が必要である。しかし、酸濃度が高すぎると、カルボン酸が DNPH-cartridge を通過してしまう恐れがある。そのため、最適な酸の量を検討した。0.1~10 % v/w のリン酸を含む DNPH 含浸シリカゲルを作成し、500 mg をカートリッジに充填した。バックアップとして 1 % v/w のリン酸を含む DNPH cartridge を 2 段目に接続し、5 ppm のギ酸標準ガスを 50 ml/min の流速で 30 分間通気した。捕集後直ちに DNPH cartridge を 80 °C で 5 時間加熱し、5 mL のアセトニトリルで溶出した後 HPLC で分析した。リン酸添加量によるヒドラジド誘導体の回収率の変化を Fig. 7 に示す。リン酸濃度が低い時と高いときにギ酸の回収率が低い。リン酸濃度が高すぎると、ギ酸等の酸性ガスは DNPH-cartridge に吸着し難いことが予測されるが、0.1~10 % v/w のリン酸濃度範囲で 2 段目の DNPH-cartridge にギ酸が検出されな

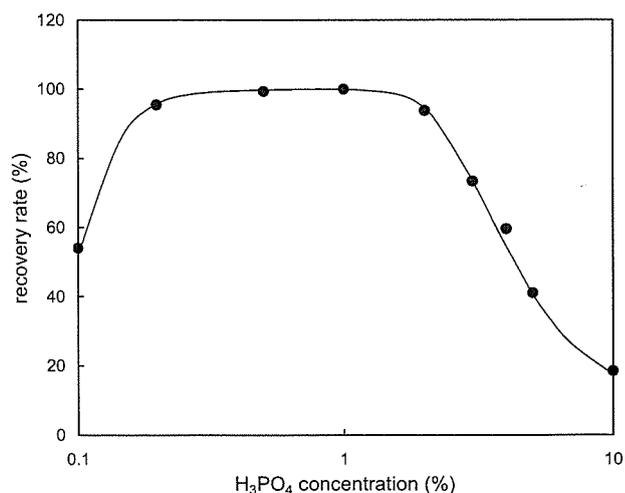


Fig. 7. Influence of phosphoric acid concentration on formation of hydrazide derivative.

ったことから、すべての実験条件で 1 段目の DNPH cartridge は完全にギ酸を捕集したことが確認された。従って、Fig. 7 の回収率は捕集効率に依存していない。リン酸濃度が 0.2~1 % のときヒドラジドへの誘導体化は完全に進行した。DNPH によるアルデヒド、ケトン類のヒドラゾン誘導体化反応は酸性の方が進行しやすいので、同時分析を考慮すると、リン酸濃度は 1 % v/w が最も適していると考えられる。これらの結果から、カルボン酸、アルデヒド、ケトン類の同時分析には、1 % v/w のリン酸濃度の DNPH 含浸シリカゲルを充填した DNPH-cartridge を使用し、捕集後カートリッジを 80 °C で 5 時間加熱することが最も適した条件である。

5. 室内空気の測定

DNPH cartridge に室内空気を 50 mL/min の流速で 24 時間通気した。捕集は平行して 2 系統で行った。捕集後、カートリッジを 20 °C または 80 °C で 5 時間加熱してから、前述の方法で DNPH 誘導体を分析した。加熱条件が 20 °C と 80 °C のときのクロマトグラムを Fig. 8 に示す。2 段目の DNPH-cartridge にはバックグラ

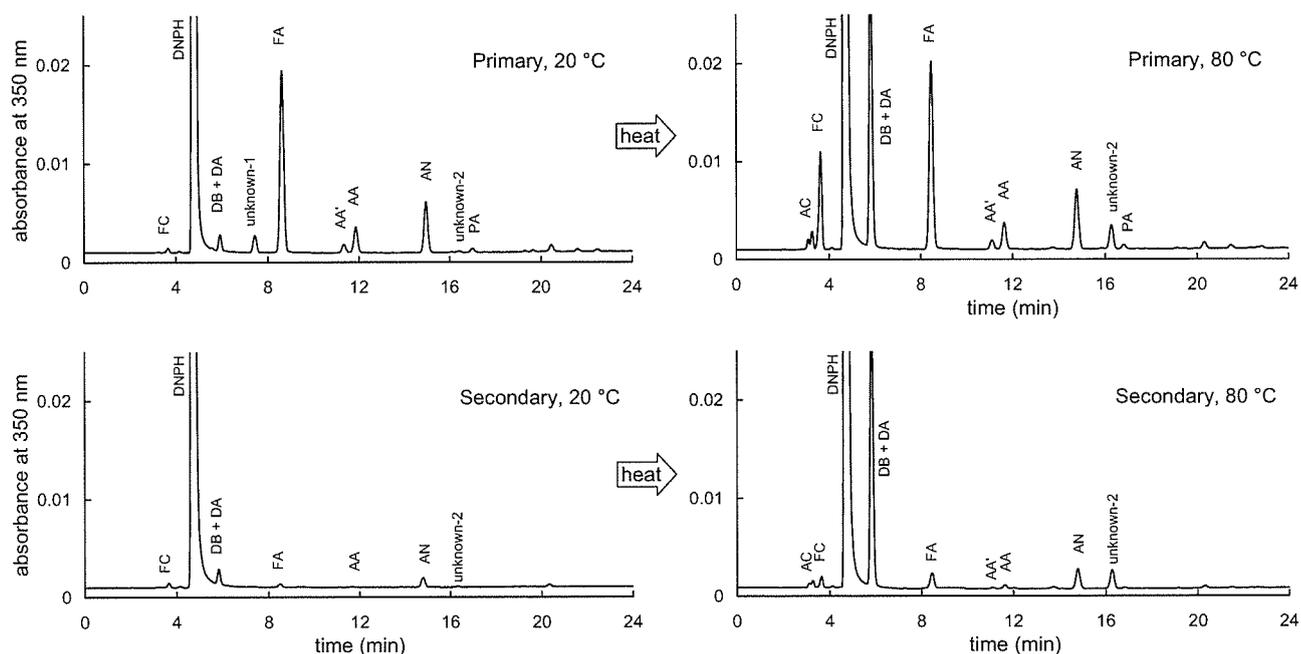


Figure 8. Chromatographic profiles of DNPH derivatives from air sample measured with a heat treatment of 80 °C and 20 °C.

FC: formic-DNPhydrazide, AC: acetic-DNPhydrazide, PC: propionic-DNPhydrazide, FA: formaldehyde-DNPhydrazone, AA: acetaldehyde-DNPhydrazone, PA: propionaldehyde-DNPhydrazone, BA: butyraldehyde-DNPhydrazone, AN: acetone, DB:

ウンドレベルの DNPH 誘導体しか検出されなかったことから、空気中のカルボン酸、アルデヒド、ケトン類は完全に 1 段目の DNPH-cartridge に捕集されたことが考えられる。ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒドなどのヒドラゾン誘導体は 20 °C と 80 °C の時でほとんど変化していないことから、20 °C で反応が終了していることがわかる。一方、ギ酸-ヒドラジド誘導体は 20 °C の時は、ほとんど検出されなかったが、80 °C のときは大きなピークが検出された。Fig. 6 のクロマトグラムでいくつかの未知物質のピークが検出されている。捕集後直後の加熱処理をしていないサンプルでは“unknown-1”のピークがしばしば現れる。捕集後長時間置いてから分析した場合“unknown-2”のピークが検出された。このことから、unknown-1 は時間により unknown-2 に変化したことが推測される。Unknown-1 の物質は DNPH とオゾンが反応して生成し

た 2,4-ジニトロフェニルアジドが考えられる³⁶⁾。この物質は熱に不安定であり、加熱することでより安定なニトロベンゾフラザン-3-オキサイド(unknown-2)に変化^{37,38)}したことが推測される。

D. 結論

カルボン酸は DNPH と反応しないとされていたが、我々は DNPH-cartridge を用いることで、C1～C4 のカルボン酸が DNPH と反応し安定なヒドラジド誘導体を生成することを発見した。これらのヒドラジド誘導体は熱安定性に優れ、極大吸収波長がアルデヒド-ヒドラゾン誘導体に近く、モル吸光係数も比較的大きいので、ヒドラゾン誘導体と同時に HPLC 分析することが可能である。RP-Amide C16 を分離カラムに用い、350 nm の検出波長で分析すれば、カルボン酸、アルデヒド、ケトン類の DNPH 誘導体を同時に測定することができる。カルボン酸と DNPH の反応は遅

いが, DNPH-cartridge を空気試料の捕集管として用い, 捕集後にカートリッジを80°C で5時間加熱することで, ギ酸を全てヒドラゾン誘導体にすることが可能であった。

E. 文献

- 1) Mader, P.P.; Cann, G.; Palmer, L. *Plant Physiol.* 1955, 30, 318.
- 2) Kumar, N.; Kulshrestha, U.C.; Khare, P.; Saxena, A.; Kumari, K.M.; Srivastava, S.S. *Atmos. Environ.* 1996, 30, 3545-3550.
- 3) Gronberg, L.; Shen, Y.; Jonsson, J.A. *J. Chromatogr. A* 1993, 655, 207-215.
- 4) Kawamura, K.; Ng, L.L.; Kaplan, I.R. *Environ. Sci. Technol.* 1985, 19, 1082-1086.
- 5) Allen, A.G., Miguel, A.H. *Atmos. Environ.* 1995, 29, 3519-3526.
- 6) Hekmat, M., Smith, R.G., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1991, 52, 332-335.
- 7) Grosjean, D.; Van-Neste, A.; Parmar, S.S. *J. Liq. Chromatogr.* 1989, 12, 3007-3017.
- 8) Lawrence, J.E.; Koutrakis, P. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 957-964.
- 9) Souza, S.R.; Vasconcellos, P.C.; Carvalho, L.R.F. *Atmos. Environ.* 1999, 33, 2563-2574.
- 10) Johnson, B.J.; Huang, S.C.; Wong, A.; Yao, L. *Microchem. J.* 1994, 49, 79-84.
- 11) Tanaka, K.; Fritz, J.S. *J. Chromatogr.* 1986, 361, 151-160.
- 12) Vainiotalo, S.; Pfaffli, P.; Zitting, A. *J. Chromatogr.* 1983, 258, 207-221.
- 13) Surowiec, K.; Dasgupta, P.K. *J. Microcolumn Sep.* 1998, 10, 265-271.
- 14) Ryhl-Svendsen, M.; Glastrup, J. *Atmos. Environ.* 2002, 36, 3909-3916.
- 15) Kobayashi, K.; Tanaka, M.; Kawai, S. *J. Chromatogr.* 1980, 187, 413-417.
- 16) Magin, D.F. *J. Chromatogr.* 1979, 178, 219-227.
- 17) Swarin, S.J.; Lipari, F. *J. Liq. Chromatogr.* 1983, 6, 425-444.
- 18) Schmied, W.; Przewosnik, M.; Baechmann, K. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 1989, 335, 464-468.
- 19) Bueldt, A.; Lindahl, R.; Levin, J.O.; Karst, U. *J. Environ. Monit.* 1999, 1, 39-43.
- 20) Cecinato, A.; Di-Palo, V.; Mabilia, R.; Possanzini, M. *Chromatographia* 2001, 54, 263-269.
- 21) Grosjean, D. *Environ. Sci. Technol.* 1982, 16, 254-262.
- 22) Kuwata, K.; Uebori, M.; Yamasaki, H.; Kuge, Y.; Kiso, Y. *Anal. Chem.* 1983, 55, 2013-2016.
- 23) Levin, J. O.; Andersson, K.; Lindahl, R.; Nilsson, C. A. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1032-1035.
- 24) Allen, C. F. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1930, 52, 2955-2959.
- 25) Brady, O. L. *J. Chem. Soc.* 1931, 756-759.
- 26) Bohlmann, F. *Chem. Ber.* 1951, 84, 490-504.
- 27) Rappoport, Z.; Sheradsky, T. *J. Chem. Soc.* 1968, 277-291.
- 28) Peters, R.; Hellenbrand, J.; Mengerink, Y.; Van der Wal, S.J. *J. Chromatogr. A* 2004, 1031, 35-50.

- 29) Miwa, H. J. Chromatogr. A 2000, 881, 365-385.
- 30) Budavari, S.; O'Neil, M.; Smith, A.; Heckelman, P.; Kinneary, J. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Chapman and Hall, London, UK, 1996; Pp. 2576.
- 31) The 2003-2004 Aldrich Handbook of Fine Chemicals.
- 32) Uchiyama, S.; Ando, M.; Aoyagi, S. J. Chromatogr. A 2003, 996, 95-102.
- 33) Behforouz, M.; Bolan, J. L.; Flynt, M. S. J. Org. Chem. 1985, 50, 1186-1189.
- 34) Binding, N.; Müller, W.; Witting, U. Fresenius' J. Anal. Chem. 1996, 356, 315-319.
- 35) Kallury, K.; Shieh, P.; Paschal, R.; Cooke, N. Supelco Rep. 1998, 17, 5-7.
- 36) Karst, U.; Binding, N.; Cammann, K.; Witting, U. Fresenius' J. Anal. Chem. 1993, 345, 48-52.
- 37) Dyall, L.K.; Kemp J.E. J. Chem. Soc. B 1968, 976-979.
- 38) Dyall, L.K.; Wah W.M. Aust. J. Chem. 1985, 38, 1045-1059.

Ⅱ－１．４．フタルアルデヒドの分析

分担研究者 大坪 泰文 千葉大学 工学部 教授
内山 茂久 千葉大学 工学部 非常勤講師
協力研究者 松島江里香 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部 協力研究員

研究要旨 フタルアルデヒドはグルタルアルデヒドの代替消毒剤として使用され始めているが、現在のところ分析方法は無い。本研究では空気中のフタルアルデヒドを2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを含浸させたシリカゲルを捕集剤とするカートリッジ (DNPH-cartridge) で捕集し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分析する方法を開発した。フタルアルデヒドはその分子構造から3つの位置異性体 (オルト, イソ, テレ) が存在する。イソとテレフタルアルデヒドの場合、DNPH が過剰の状態では合成すると、主要な生成物はビス誘導体であり、フタルアルデヒドが過剰な状態で合成すると、主要な生成物はモノ誘導体であった。一方、オルトフタルアルデヒドの場合は、どのような条件でもビス誘導体だけが生成した。DNPH-cartridge に空気試料を通気するとオルトフタルアルデヒドは完全に吸着するが、誘導体化反応は比較的遅いため、抽出溶液中には未反応のオルトフタルアルデヒドが存在した。そして、未反応のオルトフタルアルデヒドは抽出溶液中で反応が進行した。また、抽出直後はモノ誘導体とビス誘導体が共存するが、数時間で全てビス誘導体へ変わった。モノ誘導体からビス誘導体への変化はアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、酢酸エチルなどの非プロトン性極性溶媒の場合に速く、メタノールなどのプロトン性極性溶媒の場合は遅かった。例えば、アセトニトリルを抽出溶媒にした場合、4時間で全てビス誘導体へ変化した。DNPH-cartridge を用いて大気中のオルトフタルアルデヒドを HPLC で分析するとき、ビス誘導体として定量することができる

A. 研究目的

医療機関において内視鏡等の医療器具の殺菌消毒剤として広く使用されているグルタルアルデヒドは、皮膚、気道等に対する刺激性等を有する物質であり、実際に医療機関でこれを取り扱う労働者に皮膚炎等の健康障害が発生している。このため、最近、オルトフタルアルデヒドが代替として使用されるようになってきた。しかし、オルトフタルアルデヒドも皮膚や呼吸器系に

刺激を与えるという報告¹⁾もあり、安全性は確認されていない。また、分析方法も開発されていない。

空気中のグルタルアルデヒドに関しては、様々な分析方法が報告されている。最も多いのは、固体捕集-誘導体化法²⁻⁷⁾である。捕集方法としてはポンプを用いたアクティブサンプリング法、分子の自然拡散を利用した拡散捕集がある。捕集後、グルタルアルデヒドの誘導体は高速液体クロマ

トグラフィー (HPLC)^{3,4)}あるいはガスクロマトグラフィー (GC)^{2,5,7)}で分析される。

アルデヒド、ケトン類の分析として最も広く利用されているのは、アミノ基 (NH₂)を持つ化合物のカルボニル (C=O)炭素への求核付加反応、及び安定なシッフ塩基 (C=N)生成反応である。この誘導体化法は GC や HPLC において非常に有用であり、*O*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン⁷⁾、*O*-ベンジルヒドロキシルアミン⁸⁾、2-ジフェニルアセチル-1,3-インダンジオン-1-ヒドラゾン⁹⁾、5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホヒドラジン (ダンシルヒドラジン)¹⁰⁾、*N*-メチル-4-ヒドラジノ-7-ニトロベンゾフラザン¹¹⁾、ペンタフルオロフェニルヒドラジン¹²⁻¹⁴⁾、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH)¹⁵⁻¹⁷⁾などの多くの誘導体化試薬が使用されている。特に、DNPH とアルデヒド、ケトン類の反応は 80 年近く前から研究されてきた。アルデヒド、ケトン類の DNPH 誘導体は 360 nm 付近に極大吸収波長をもつため、UV 検出器を備えた HPLC で分析されることが多い^{18,19)}。近年、DNPH-HPLC 法は大気中のカルボニル化合物の分析方法として最も広く利用され、アクティブサンプリング²⁰⁾、拡散サンプリング²¹⁾に応用されている。しかし、OPA などのようなジアルデヒド類の DNPH 誘導体に関する情報は皆無である。ジアルデヒドと DNPH が反応するとき、生成物がモノ誘導体なのか、ビス誘導体なのか、あるいはその混合物なのかは非常に重要なことである。誘導体の構造が分からなければ、定量することができない。そこで、本研究では OPA と DNPH の反応メカニズムを明らかにし、空気中の OPA 濃度を測定する方法を開発した。

B. 研究方法

装置：HPLC は 2 台の送液ポンプ

LC-10ADvp, オートサンプラー SIL-10Advp, 紫外検出器 SPD-10Avp, フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M10Avp を備えた LC-10 (島津製作所製) を使用した。分離カラムは Ascentis RP-Amide (250 mmL × 4.6 mm i.d. 5 μm particle size, スペルコ社製) を用いた。送液は移動相 A: アセトニトリル/水, 40/60 v/v, 移動相 B: アセトニトリル/水, 75/25 v/v を使い、グラジエント分析の場合は以下のプログラムで 2 液グラジエント分析を行った。

Time (min)	0	8	30	60
A (%)	100	100	0	0

流速は 1.5 mL/min であった。アイソクラティック分析の場合は、アセトニトリル/水, 70/30 v/v の移動相を用い、流速は 2.5 mL/min であった。フタルアルデヒド-DNPH 誘導体の構造解析にはフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR Spectrum One, パーキンエルマー社製) を使用した。

試薬：HPLC および試薬の調整には Milli-Q Water System を使用した。アセトニトリルは HPLC grade (和光純薬工業製)、オルトフタルアルデヒド (OPA, 97%), イソフタルアルデヒド (IPA, 97%), テレフタルアルデヒド (TPA, 99%), 酪酸 (99%), ホルムアルデヒド (37% 水溶液), アセトアルデヒド (99.5%), プロピオンアルデヒド (97%), ブチルアルデヒド (99.5%), シリカゲル (Davisil™ grade 635, 60-100 mesh) はアルドリッチ社製を使用した。その他、DNPH (containing approx. 50% water), メタノール, ジメチルスルホキシド, 酢酸

エチル，リン酸(>85%)は和光純薬工業製，2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩(>85%)は関東化学社製を使用した。

1. フタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の合成

DNPH 溶液の調整：5 g の DNPH 塩酸塩を濃硫酸 50 mL に溶かした後，エタノール/水，250/70 v/v の混合溶液を加えよく攪拌する。

2. DNPH が過剰な条件での合成

OPA，IPA，TPA をそれぞれ 0.67 g 秤量し，エタノール 100 mL に溶かす。この溶液に DNPH 溶液を 350 mL 加えよく攪拌する。沈殿をろ過した後，純水 3000 mL，メタノール 500 mL，最後にアセトニトリル 500 mL で洗浄する。残渣をロータリーエバポレーターで恒量になるまで減圧乾燥した。

3. フタルアルデヒドが過剰な条件での合成

OPA，IPA，TPA をそれぞれ 2.64 g 秤量し，エタノール 200 mL に溶かす。この溶液に DNPH 溶液を 87 mL 加えよく攪拌する。沈殿をろ過した後，純水 2000 mL，メタノール 500 mL，最後にアセトニトリル 500 mL で洗浄する。残渣をロータリーエバポレーターで恒量になるまで減圧乾燥した。

フタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体は有機溶媒に対して，溶解度が非常に小さい。アセトニトリルの場合，OPA-DNPH 誘導体の飽和溶液は約 6 mg/L である。

4. OPA 捕集用 DNPH-cartridge の作製

50 g のシリカゲルを 500 mL の純水で3回，

ついで 500 mL のメタノールで2回，最後に 500 mL のアセトニトリルで2回洗浄する。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 0.25 g とリン酸 1 mL をアセトニトリル 50 mL に溶かす。この溶液に洗浄したシリカゲル (50 g) を加え，よく攪拌する。40°C に設定したロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ，アセトニトリルを完全に取り除く。DNPH 含浸シリカゲル 500 mg をレゾリアンチューブ (1 mL，スペルコ社製) に充填し冷暗所 (4 °C) に保存した。

ギ酸標準ガスの発生と DNPH-cartridge による捕集

ギ酸の標準ガスはガス発生器 (パーミエーター PD-1B, GASTEC 社製) を用いて発生させた。ディフージョンチューブ (3 mm i.d.) に OPA を約 2 mL 加え，50.0 °C に設定したパーミエーターに入れるた後，純空気を一定の流速でパーミエーターに流す。ギ酸標準ガスの濃度は，ディフージョンチューブの減少したギ酸の重量と導入した純空気の量から計算できる。例えば，ギ酸標準ガスは 50°C の温度で 200 mL/min の流速のとき 0.3 mg/m³ の濃度である。

DNPH-cartridge の一端をチャンバーに接続し，もう一方をマスコントローラーを備えた定流量ポンプ (SP 208 Dual, GL サイエンス社製) に接続した。DNPH-cartridge に OPA 標準ガスを 50 mL/min の流速で 5 時間通気した後，カートリッジから DNPH 誘導体をアセトニトリル 5 mL で抽出した。抽出溶液の 20 µL を分取し，HPLC に導入した。

C. 研究結果および考察

1. フタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の特性

オルト，イソ，テレフタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体を各 2 mg 秤量し，1000 mL のジメチルスル

ホキシドに溶かした後、HPLCでアイソク
ラティック分析を行った。Fig.1にDNPH
過剰 (×4 mol) の条件で合成したクロマト
グラムとフタルアルデヒド過剰 (×4 mol)
の条件で合成したクロマトグラムを示す。

図中でアルデヒドが過剰の条件で合成
した誘導体のクロマトグラムは“-A”で、
DNPH が過剰の条件で合成した誘導体の
クロマトグラムは“-D”で表示した。いずれ
の条件でも OPA-DNPH 誘導体は1つのピー
クしか現れなかったが、IPA-DNPH と
TPA-DNPH の場合は 2 つのピークが検出
された。保持時間の早いピークにおいて、
IPA-A と TPA-A はそれぞれ対応する
IPA-D と TPA-D よりピーク面積が大きい。
一方、保持時間の遅いほうのピークでは、
IPA-D と TPA-D はそれぞれ対応する
IPA-A と TPA-A よりピーク面積が大きか
った。フタルアルデヒドのようなジアルデ
ヒドは、モノ誘導体とビス誘導体、あるい
は両方の誘導体を生成する可能性がある。
保持時間の早いピークはモノ誘導体であり、
遅いピークはビス誘導体であると推測され
る。OPA-A, IPA-A, TPA-A の FTIR スペ
クトルを Fig. 2 に示す。IPA-A と TPA-A は
1691 cm^{-1} にカルボニル ($>\text{C}=\text{O}$) の伸縮振
動が検出された。したがって、モノ誘導体
を含むことがわかる。一方、OPA-A の場合
カルボニルの伸縮振動が検出されなかつた
ことからビス誘導体のみで構成されることが
推測される。これらの結果から、フタル
アルデヒドが過剰の条件では、IPA, TPA
は主にモノ誘導体を生成し、逆に DNPH が
過剰のときは、IPA, TPA は主にビス誘導
体を生成するが、OPA はどちらの条件でも
ビス誘導体のみを生成することが明らかにな
った。OPA-DNPH, IPA-DNPH, TPA-DNPH 誘導体(各 5 $\mu\text{mol/L}$ ジメチルス
ルホキシド溶液)の紫外吸収スペクトルを
Fig. 3 に示す。

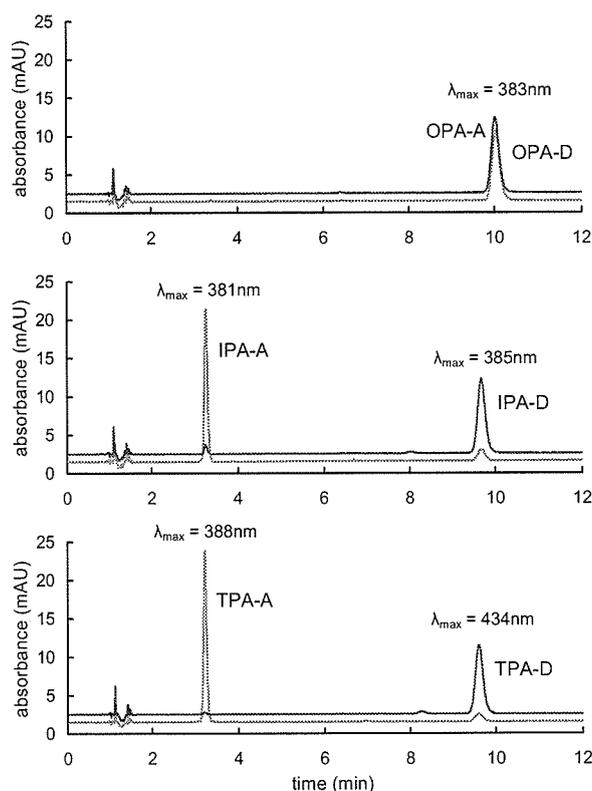


Fig. 1. HPLC chromatograms of OPA-DNPhydrazone (upper), IPA-DNPhydrazone (middle) and TPA-DNPhydrazone (lower) at maximum wavelengths by photo diode array detector. Light-colored chromatograms indicates the derivatives synthesized with excess of aldehyde and dark-colored chromatograms indicates the derivatives synthesized with excess of DNPH. Each concentration was 2 mg/L.

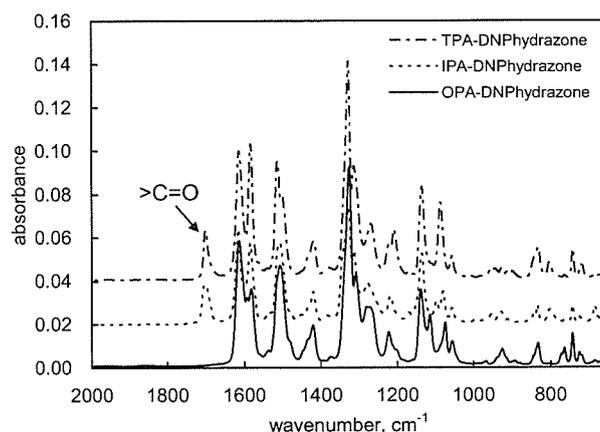


Fig. 2. FTIR spectra of OPA-A, IPA-A and TPA-A.

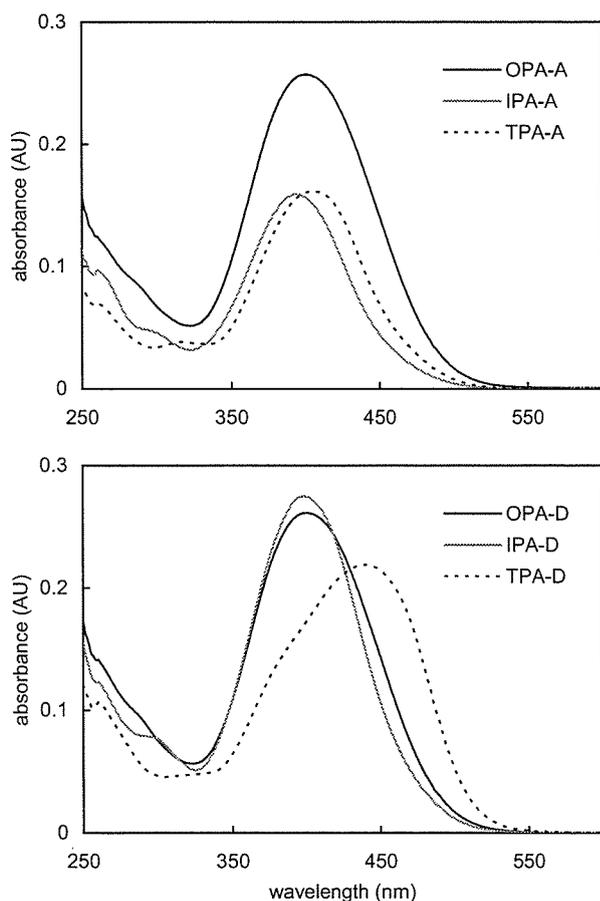


Fig. 3. UV-Visible spectra of OPA-, IPA and TPA-DNPhydrazone at 5 $\mu\text{mol/L}$.

Fig. 2 の結果にしたがって、OPA-A, OPA-D, IPA-D, TPA-D はビス誘導体として、IPA-A, IPA-A はモノ誘導体として調整した。TPA-D を除いて、全ての紫外吸収スペクトルは共役二重結合を有する 2-アルケナール、ベンズアルデヒド²²⁾の DNPH 誘導体のスペクトルに類似した。OPA-A, IPA-A, TPA-A, OPA-D, IPA-D, TPA-D の極大吸収波長は 400, 394, 404, 400, 398, 440 nm であった。そして、アセトニトリル溶液より 10~17 nm 長波長側に偏った。TPA-D のスペクトルは特異であり、440 nm 以外に 390 nm 付近の吸収も示唆される。ビス誘導体である OPA-D と IPA-D のモル吸光係数はそれぞれ 5.2×10^4 と 5.4×10^4 L/mol/cm であった。一方、モノ誘導体である IPA-A と TPA-A の

モル吸光係数はそれぞれ 3.1×10^4 と 3.2×10^4 L/mol/cm であった。すなわち、ビス誘導体のモル吸光係数はモノ誘導体より 1.7 倍大きいことになる。

2. オルトフタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の変移

DNPH-cartridge に OPA 標準ガスを 50 mL/min の流速で 5 時間通気した。その後、直ちに 5 mL の溶媒（アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、メタノール）で抽出し、25°C に保った。アイソクラティックの HPLC で抽出液を 13 分毎に分析した。全ての溶媒で、モノ誘導体とビス誘導体の 2 つのピークが検出されたが、抽出溶液中でモノ誘導体はビス誘導体に変移した。抽出溶媒としてアセトニトリルを使用したときの、モノ誘導体からビス誘導体へ変移をの Fig. 4 に示す。前述したように、OPA-DNPH の合成時には、どんな条件でもモノ誘導体は検出されなかった。しかし、DNPH-cartridge を使用した OPA の捕集時の反応は、モノ誘導体を生じた。OPA-モノ誘導体を単体で合成することができないので、OPA-モノ誘導体の濃度をピーク面積から計算することは不可能である。前述したように、極大吸収波長においてビス誘導体のモル吸光係数はモノ誘導体より 1.7 倍大きい。OPA-D のスペクトルは IPA-D と非常によく似ているので、OPA-モノ誘導体と IPA-モノ誘導体のモル吸光係数が等しいと仮定すれば、OPA-モノ誘導体のピーク面積は IPA-A のピーク面積から推定できる。Fig. 4 の B において OPA-モノ誘導体のデータは OPA モノ誘導体に対するモル吸光係数の比率 (1.7) を乗じることで変換してある。抽出直後はモノ誘導体の量はビス誘導体より多い。しかし、時間が経つとモノ誘導体は減少し、ビス誘導体が増加した。そして、ビス誘導体は 0.032

μmol に相当する最大のピーク面積 (3.9×10^5) に達し、72 時間後でもビス誘導体の量は変化しなかった。抽出後してから 29 分後に総 OPA 誘導体量 (モノ+ビス) が最大のピーク面積に達した。総誘導体量 OPA の抽出直後 (3 分後) は最大ピーク面積の 71% であった。これらの結果から、DNPH-cartridge 内での DNPH と OPA の反応は比較的遅く、アセトニトリルで抽出してから反応が進行することが推測される。

OPA-モノ誘導体からビス誘導体への変換は溶媒の種類によって異なる。ジメチルスルホキシド (DMSO) を抽出溶媒にしたときのモノ誘導体からビス誘導体へ変移を Fig. 5 に示す。OPA と DNPH の反応速度は、ジメチルスルホキシドを溶媒にした方がアセトニトリルのときより遅い。0.033 μmol に相当する最大ピーク面積 (3.9×10^5) は抽出後 240 分で得られた。モノ誘導体からビス誘導体へ変移もアセトニトリルと異なり、抽出後 240 分経過しても、モノ誘導体量の方がビス誘導体量より多かった。しかし、72 時間後にはモノ誘導体は検出されず、0.033 μmol に相当する最大のピーク面積 (4.0×10^5) に達し、全てビス誘導体に変移したことが確認された。酢酸エチルを抽出溶媒にした場合は、OPA と DNPH の反応速度は非常に速かった。酢酸エチル (EtAc) を抽出溶媒にしたときの、モノ誘導体からビス誘導体へ変移を Fig. 6 に示す。抽出直後 (3 分) に 0.031 μmol に相当する最大ピーク面積 (3.8×10^5) が観測された。抽出直後はモノ誘導体の量はビス誘導体より多い。しかし、時間が経つとモノ誘導体は減少し、ビス誘導体が増加した。抽出直後 (3 分) は 61% であったモノ誘導体が 240 分後には 17% にまで減少し、ビス誘導体は 39% から 83% に増加した。

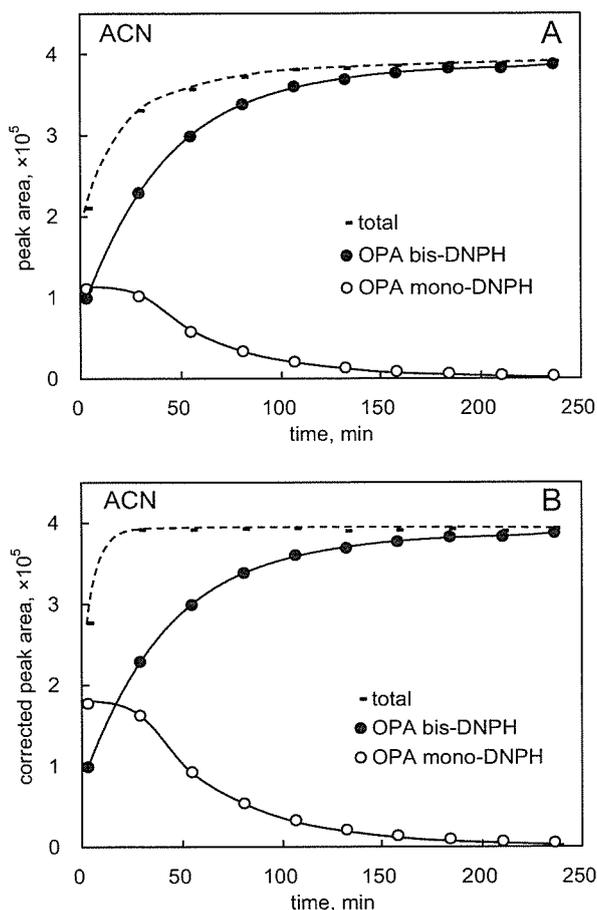


Fig. 4. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in acetonitrile. (Panel A) OPA mono-DNPhydrazone data were read directly. (Panel B) OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

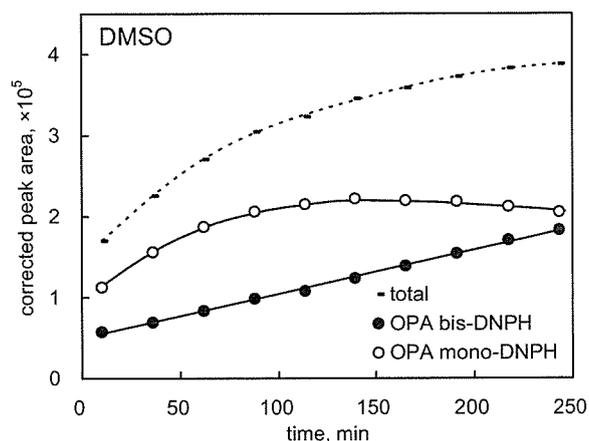


Fig. 5. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in dimethyl sulfoxide. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

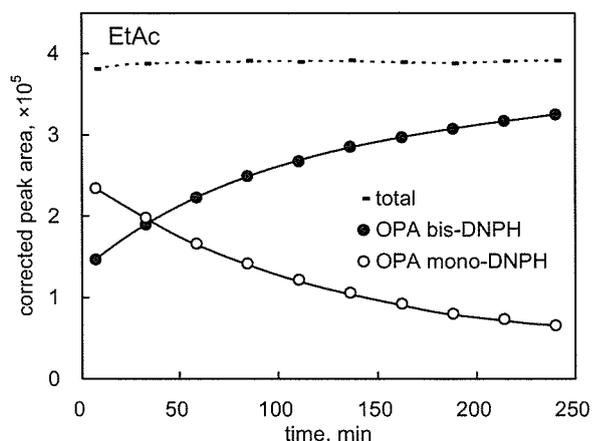


Fig. 6. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in ethyl acetate. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

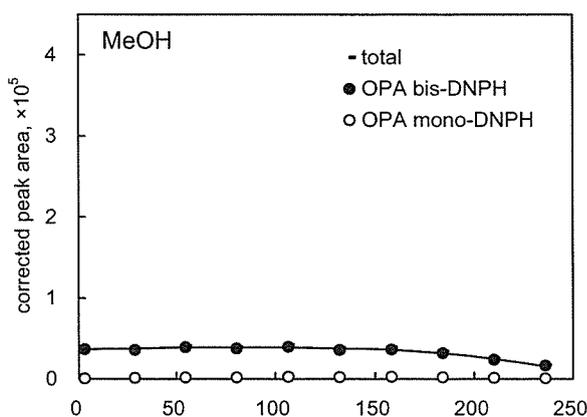
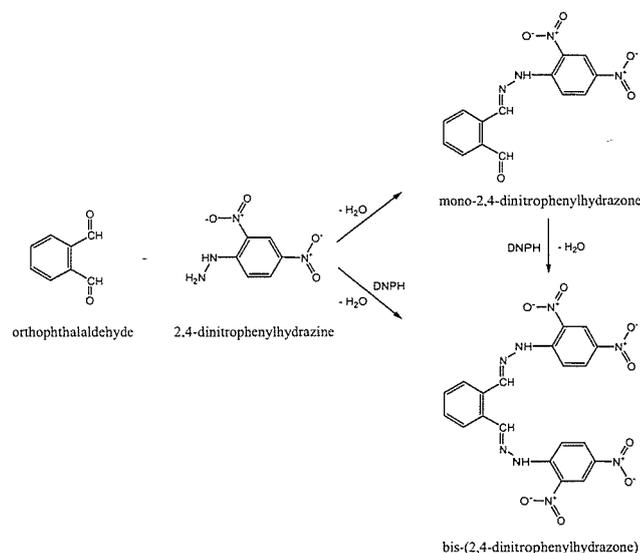


Fig. 7. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in methanol. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7).

そして、ビス誘導体は 0.034 μmol に相当する最大のピーク面積 (4.1×10^5) に達し、72 時間後でもビス誘導体の量は変化しなかった。

OPA と DNPH の反応は非プロトン性極性溶媒で進みやすく、モノ誘導体からビス誘導体への変移は以下の反応により進行することが推測される。

メタノールを抽出溶媒としたときのモノ誘導体からビス誘導体への変移を Fig. 7 に示す。OPA と DNPH の反応は非常に遅く、また、モノ誘導体のピークは検出されなかった。抽出後 230 分間における最大ピーク面積 (0.43×10^5) は非常に小さく、



0.0035 μmol の OPA しか検出されなかった。抽出してから 72 時間後、モノ誘導体は検出されず、ビス誘導体は 0.0082 μmol に相当する 1.0×10^5 のピーク面積しか検出されなかった。このことから、OPA と DNPH の反応はアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、酢酸エチルなどの非プロトン性極性溶媒の場合進行しやすいが、メタノールなどのプロトン性極性溶媒の場合進行しにくいことが分かる。また、OPA-モノ誘導体からビス誘導体への変移は最終的に全ての溶媒で起こることが推測される。

3. 病院の洗浄室に置ける OPA の測定

病院の内視鏡消毒洗浄室の空気を 250 mg の DNPH-シリカゲルを充填した DSD-DNPH²³⁾ を使用して測定した。測定時間は 5 時間である。捕集後 DSD-DNPH をアルミ製保存袋から取り出し 4~5 回振った後、拡散フィルター側を上にしてシェルターを取り外す。DSD-DNPH のキャップ側を実験台等でタッピングした後、拡散フィルターを取り外し、アセトニトリルを満たした 10 ml の注射筒を取り付ける。2~5 ml/min の流速で溶出し、5 ml に定容する。溶出液の 20 μl を分取し、グラジエントプログラムの HPLC に導入した。Fig. 8 に