

Fig. 7 カンゾウ油性抽出物及びカンゾウ製品で検出された
主要ピークのMSスペクトル (ESI+)

peak I ~ VII, XI, XII : KZ09

peak VIII : KZ01

peak IX, X: KZ02

Ⅱ. 分担研究報告書

3. 既存添加物の成分規格試験法の検討

- 3.1. 定量 NMR 法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究
- 3.2. カラメルⅢ中の 2-アセチル-4-テトラヒドロ
キシブチルイミダゾール分析法の改良

分担研究課題 定量NMR法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究

研究分担者 水上 元

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 既存添加物中の指標成分の定量分析への定量NMR法の適用について検討した。昨年度に確立したベニバナ赤色素中の主要色素成分であるcarthaminのqNMRによる定量について、得られた定量値と吸光度法による定量の結果を比較するとともに、qNMR法による定量限界を検討した。次に、ヤマモモ抽出物中の抗酸化物質であるmyricitrinについて、市販標準品の純度をqNMR法によって評価するとともに、ヤマモモ抽出物製品のmyricitrin含量を測定した。

A. 研究目的

$^1\text{H-NMR}$ におけるシグナル面積比は分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例している。また、一定の濃度の化合物のプロトン当たりのシグナル面積は、化合物の種類によらずに一定である。したがって、濃度が既知の物質と濃度未知の試料の $^1\text{H-NMR}$ を同時に測定することによって、そのシグナル面積比から未知試料の定量が可能になる。NMRを利用したこのような定量法は、qHNMR（proton-specific quantitative NMR）法と呼ばれ、以下のような利点を有している。

(1) $^1\text{H-NMR}$ が測定できる試料を作製するだけで特別な前処理が必要なく、また対象化合物に応じた測定条件の検討も不要である。測定時間も1試料15分程度であるため、測定準備及び測定に要する時間は短時間で済む。

(2) クロマトグラフ法と異なり、検量線を作製する必要がないため、測定対象化合物の標準物質がなくても測定が可能である。

(3) 溶媒や試料中の他の水素シグナルから独立したシグナルを有する化合物であれば複数の化合物も同時に測定が可能である。

本研究では、qHNMR法のこのような特徴に着目し、既存添加物中の指標成分の定量への応用を目的として研究を実施している。本年度は、(1) 昨年度の「ベニバナ赤色素」中の赤色素成分carthaminの $^1\text{H-NMR}$ を利用する定量法に関する研究を継続し、指標シグナルとして使用したcarthaminの16位の水素に由来するシグナルに加えて、8,8'および9,9'のプロトンに由来するシグナルを指標として用いた定量を行いデータを比較するとともに、(2) qHNMR法による定量結果と吸光係数に基づく吸光度測定法による定量値を比較した。さらに、抗酸化性既存添加物として用いられるヤマモモ抽出物に含まれる抗酸化成分であるmyricitrinについて、市販標準品の純度の検定と製品中のmyricitrin含量の測定をqHNMR法を用いて行った。

B. 研究材料と方法

化合物

認証標準物質であるbisphenol A (NMIJ CRM 4030 A) および定量NMR用基準物質1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_6 (1,4-BTMSB)は和光純薬から購入した。その他の試薬は、すべて市販品を用いた。

「ベニバナ赤色素」および「ヤマモモ抽出物」

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部から提供されたものを用いた(表1)。

HMD濃度の測定

Hexamethyldisilane (HMD) の約10 mgを精確に秤取り、pyridine- d_5 50.0mLに溶解したものをqHNMR reference stock solutionとして用いた。Bisphenol A 約10.0 mgを精秤しqHNMR reference stock solution 1.00 mLに溶解して、 ^1H -NMRスペクトルを測定した。HMDに由来する δ 0 ppmのシグナル強度とPHPのメチル基水素に由来する δ 1.62 ppmのシグナル強度との比から、qHNMR reference stock solutionに含まれるHMDの量を求めた。

「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量

「ベニバナ赤色素」約150 mgまたは1.00 gを精秤しmethanol 約1 mL または7 mLを加えて室温で30分間、超音波抽出した。抽出液を1500rpmで3分間遠心分離することにより上清を得た。この操作を3回繰り返して、上清を合わせて減圧濃縮した。得られた抽出物を1.00 mLのqHNMR用標準液に溶かしたものをNMR測定用試料とした。測定用試料0.600 mLにmetanaol- d_4 30.0 μL を加えてNMRを測定した。

1,4-BTMSB溶液の作製

1,4-BTMSB (qHNMR用認証標準物質) 約25.00mgを精確に秤取りacetone- d_6 25.0 mLに溶解して、1,4-BTMSBの1.0 mg/mL溶液を調製し

た。

Myricitrin標準品の純度の検定

Myricetin 約3.00mgを正確に秤取り、1,4-BTMSB溶液1.00 mlに溶解した。この溶液の0.600 mlを用いてNMRを測定した。

「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含量の測定

「ヤマモモ抽出物」約100mgを正確に秤取り、BTMSB溶液1.00 mlに懸濁して10min間超音波抽出した。懸濁液を4°C、10,000 x g で10分間遠心して得た上清0.600 mlのNMRを測定した。

NMR装置と測定条件

^1H -NMRスペクトルの測定にはJEOL JNM-ECA500 (500 MHz)を用いた。NMRの測定は、杉本らの報告¹⁾に準じて行なった。

C. 結果と考察

1. 「ベニバナ赤色素」のcarthamin含量の測定

昨年度の研究において使用したcarthaminの16位のプロトンに由来するシグナル(9.34ppm)に加えて、8,8'位のプロトンに由来するシグナル(8.21ppm, doublet) および9,9'位に相当するシグナル(8.03ppm, doublet) のシグナル²⁾を指標シグナルとして、「ベニバナ赤色素 (sample C)」に含まれるcarthamin含量を測定した(図1)。

その結果、いずれのシグナルを用いた場合においても定量値にほとんど差はなく、他のシグナルと充分に分離していれば、どのようなプロトンに由来するシグナルでも使用可能であることが確認できた(表2)。

次に、報告されているcarthaminの530nmにおける吸光係数³⁾をもとに吸光度から求めた定量値とqHNMR法による定量値を比較した(表3)。5つの製品について両者を比較したところ高い相関性を示したが、いずれのサンプルについて

も吸光係数に基づく方法で得た定量値の方が高くなった。これは、(1) 吸光度の測定に用いられたcarthamin標準品の純度が低く、報告されている吸光係数が真の値よりも低いこと、および(2) 「ベニバナ赤色素」中に530nm付近に吸収を有する別の物質が存在していることによるものと考えられる。

2. qHNMRによるmyricitrin標準品の純度の測定

ヤマモモ抽出物に含まれる抗酸化物質であるmyricitrinの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて検定することを目的として研究を実施した。まず、myricitrinのNMRスペクトルを測定したところ、H-2',6' (6.93ppm, singlet)、H-8 (6.37ppm, doublet)、H-6 (6.18ppm, doublet)のシグナルが明瞭に観察された(図2A、B)。そこで、これらのプロトンシグナルを指標とし、qHNMR用の認証標準物質であるBTMSBを基準としてmyricitrin (Sample 1)の純度を求めた(表4)。Carthaminと同様に用いるプロトン間で定量値にほとんど差はなかったため、以下の実験では最も低磁場に存在しているH-2',6'のプロトンを用いることとした。

3種の市販標準品のqHNMR法によって決定した純度を表6に示した。各標準品の純度は88~90%の範囲にあり、カタログ記載の純度よりもかなり低いことが明らかになった(表6)。これは、表示純度がHPLCによって評価されているために用いた検出系によっては検出できなかったり、カラムから溶出しない不純物が存在していることと、含まれている水分の評価が出来ないことによるものと考えられる。

次に食品添加物製品である「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含量のqHNMRによる定量を試みたところ、 $29.2 \pm 0.29\%$ という値が得られた(図2C)。HPLC法による定量を行い、測定値の比較・検証を行って行くことが必要である。

D. 結論

昨年度報告した「ベニバナ赤色素」中のcarthamin含量のqHNMR法による定量について補充的な検討を行い、昨年度の研究で使用した16位のプロトンに加えて、8,8'位および9,9'位のプロトンを用いても定量可能であり、測定値は非常によく一致することを示した。qHNMR法によって得た定量値は、文献上に報告されている吸光係数を用いる方法に比較して低くなった。

Myricitrinの2',6'位のシグナルを用いて市販のmyricitrin標準品の純度を評価できた。このようにして純度を評価した標準品を用いてHPLCの定量が可能になるものと考えられる。

引用文献

- 1) 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斉藤 剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎 壮、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治：qNMRに基づく有機リン系農薬イソキササンチンオキシソンの品質管理、*日本食品化学会雑誌* **16**, 28-33 (2010).
- 2) Sato, K., Sugimoto, N., Ohta, M., Yamazaki, T., Maitani, T., Tanamoto, K.: Structure determination of minor red pigment in carthamus red colorant isolated by preparative LC/MS, *Food Additives and Contaminants*, **20**, 1015-1012 (2003).
- 3) Morimoto, T., Kato, Y., Nakamura, M. Determination of the content of coloring Matter in Carthamus Red and Carthamus Yellow, *Japanese Journal of Food Chemistry*, **5**, 236-238 (1998).

E. 研究発表

(2) 学会発表

河野桂子、吉田貴光、杉本直樹、山崎 壮、西村哲治、永津明人、水上 元：qHNMR法による「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量。日本食品化学学会第17回総会・学術大会、2011年5月19日、東京。

吉田貴光、河野桂子、杉本直樹、山崎 壮、西村哲治、永津明人、水上 元：定量NMR法による「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量。日本薬学会東海支部大会、2011年6月7日、名古屋。

Yoshida, T., Hasada, K., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Quantitative analysis of natural products by qNMR. Pytochemical Society of North America 50th Anniversary Meeting. December 13, 2011, Fairmont Orchid Hawaii.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 供試した「ベニバナ赤色素」および「ヤマモモ抽出物」製品

コード	性状	色価
ベニバナ赤色素		
Sample A	粉末	—
Sample B	粉末	—
Sample C	粉末	1375
Sample D	粉末	45.5
Sample E	粉末	743
ヤマモモ抽出物		
Sample F	粉末	—

表2 3種のプロトンを指標シグナルとして測定したcarthamin含量

指標として用いたプロトンシグナル	Carthamin含量 (%) ^{a)}
H-16 (9.31ppm, singlet)	10.32 ± 0.01
H-8,8'(8.21ppm, doublet)	10.29 ± 0.03
H-9,9'(8.03ppm, doublet)	10.33 ± 0.12

- a) 「ベニバナ赤色素」 (Sample C) を用いた。
データはaverage ± standard deviation (n=3) で示した。

表3 qHNMR法と吸光度測定法による定量値の比較

	Carthamin含量 (%) ^{a)} (qHNMR法による定量値)	Carthamin含量 (%) ^{a)} (吸光度測定法 ^{b)} による定量値)
Sample A	13.6 ± 0.06	18.1 ± 0.61
Sample B	0.0913 ± 0.002	0.133 ± 0.004
Sample C	10.3 ± 0.01	14.1 ± 0.43
Sample D	0.261 ± 0.001	0.336 ± 0.03
Sample E	5.58 ± 0.07	7.45 ± 0.23

- a) データはaverage ± standard deviation (n=3) で示した。
b) 吸光係数 (E1%=992 at 530 nm) を用いて測定した。

表4 供試した市販のmyricitrin標準品

Sample code	名称	規格
Sample A	Myricitrin with HPLC	純度 >99% (HPLC)
Sample B	Myricitrin	純度 >99% (HPLC)
Sample C	Myricitrin analytical standard	Purity >95% (HPLC)

表5 3種のプロトンを指標シグナルとして測定したmyricitrin含量

指標として用いたプロトンシグナル	Myricitrin純度 (%) ^{a)}
H-2',6' (6.85ppm, singlet)	89.9 ± 1.31
H-8 (6.21ppm, doublet)	90.1 ± 2.11
H-6 (6.00ppm, doublet)	90.1 ± 1.74

a) Myricitrin Sample Aを用いた。

データは、average ± standard deviation (n=3) で示した。

表6 供試した市販のmyricitrin標準品のmyricitrin含量

Sample code	名称	qHNMRによる純度 (%) ^{a)}
Sample A	Myricitrin with HPLC	89.9 ± 1.31
Sample B	Myricitrin	87.8 ± 1.05
Sample C	Myricitrin analytical standard	87.9 ± 0.48

a) データは、average ± standard deviation (n=3) で示した。

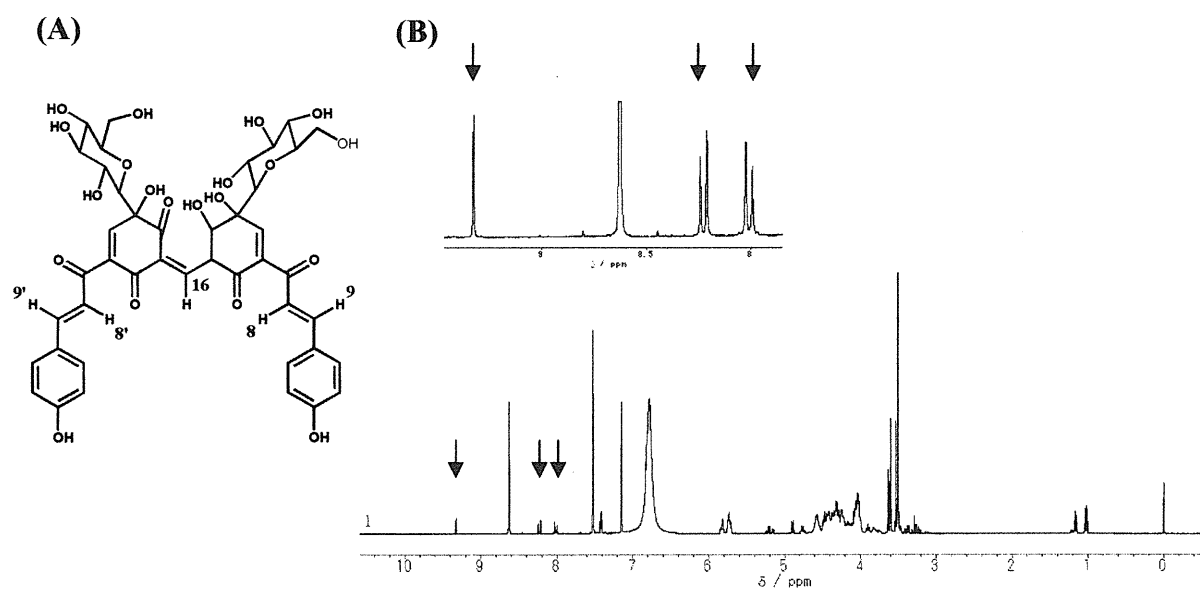
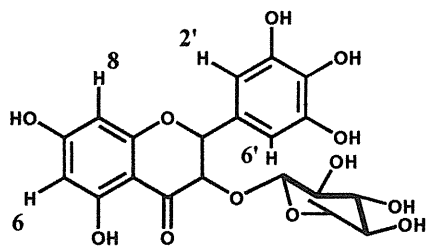
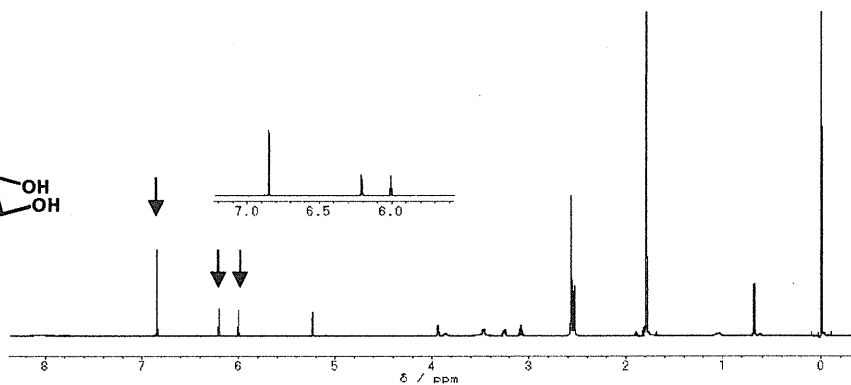


図1 (A) Carthaminの化学構造。(B) 「ベニバナ赤色素」 (Sample C) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。矢印は、低磁場側からH-16、H-8,8'、H-9,9'に由来するシグナルを示している。

(A)



(B)



(C)

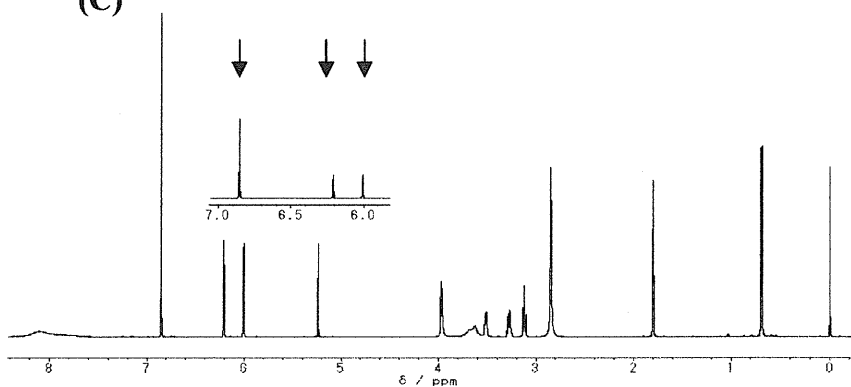


図2 (A) Myricitrinの化学構造。(B) Myricitrinの¹H-NMRスペクトル。矢印は、低磁場側からH-2'、6'、H-8、H-6のシグナルを示している。(C) 「ヤマモモ抽出物」の¹H-NMRスペクトル。

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成23年度分担研究報告書

カラメルⅢ中の2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール分析法の改良

研究協力者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究要旨 . カラメルⅢ(アンモニウム化合物添加)に含まれる2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI)を, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)と反応させてヒドラゾン(THI-DNPH)とした後にHPLCで分離して定量する純度試験において, 第8版食品添加物公定書の方法では夾雑物との分離が不十分であるため, HPLCの溶媒比の変更を検討した. また, 市販カラムでの分離を比較した. その結果, 極大吸収波長359nmの不純物ピークと分離できた場合に正しい定量値が得られると考えられた. また, 溶媒として0.1mol/Lリン酸/メタノール混液(68:32)を, カラムとしてTSK-GEL Octyl-80Tsを用いる時に良好な分離が得られた. 規格におけるカラムおよび選定の条件として, THI-DNPHのスペクトルが標準品と同等であることを利用できる可能性が示された.

A. 研究目的

カラメルⅢ(製造時にアンモニウム化合物添加)にはラットにおいてリンパ球減少作用や免疫毒性が報告されている2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI, 図1)の存在が知られており, 第7版食品添加物公定書でカラメルの規格が記載された時に純度試験としてTHI定量法が設定された. 第8版公定書でも, 6点の検量線に変更, HPLC流量を規定しない, などの変更点はあるが, ほぼ同じ方法である. この方法はKröplienにより考案されたもの¹⁾で, JECFA, EUでも同様の方法を用いている. 第8版公定書の方法を資料1に示した.

陽イオン交換カラムで精製した後, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH, 図1)と反応させてヒドラゾン(THI-DNPH, 図1)とした後にオクチルカラムを用いて0.1mol/Lリン酸/メタノール(1:1)を溶媒とするHPLCで分離して定量する方法である. 標準物質であるTHIも試験機関毎にTHI-DNPHを合成して保

存し, 使用する.

公定書の方法では夾雑物との分離が不十分であることが指摘されている. THI-DNPHはカラメルに由来する夾雑物の大きな山の中にあり, 定量値の信頼性に疑問がある. また, JECFA規格には推奨カラムが記述されているが, 粒子径10 μ mの破碎型充填剤を使用しており, 一般的な粒子径5 μ mのビーズ状充填剤ではない.

そこで, 広く市販されているカラムを用いた信頼性の高いHPLC分析法の開発を目的として, THI-DNPHと不純物の分離や定量の信頼性に対する溶媒の影響やカラムの種類の影響を検討した.

B. 研究方法

1. 試料

(1) カラメルⅢ製品: 日本カラメル工業会より6製品を1ロットずつ入手した.

粉末製品: H23-1A, H23-3A, H23-5A

液状製品: H23-2A, H23-4A, H23-6A

(2) THI: 日本カラメル工業会より100mgを入手し

た。

2. 試薬

リン酸, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン, メタノール, エタノールは特級の試薬を用いた。ただし HPLC の溶媒には HPLC 用メタノールを用いた。

3. 器具および装置

(1) 組み合わせカラム

公定書規格に合う物を製造して使用した。上部カラム充填剤として Amberlite CG-50 を、下部カラム充填剤として Dowex 50W-X8 を使用した。いずれも和光純薬工業から購入した。

(2) HPLC

Alliance Separations Module 2695 および Photodiode Array Detector 2996 (Waters)

(3) HPLC カラム

いずれも内径 4.6 mm, カラム長 250 mm.

①COSMOSIL 5C8 MS, 粒子径 5 μ m

Nacalai Tesque 製, シリアル番号(s/n)K16601

②シリカ 5C8 4, 粒子径 5 μ m

昭和電工製, s/n K201772

③Spherisorb S5 C, 粒子径 5 μ m

Waters 製, s/n 0140320301

④Wakosil-II 5C8 H, 粒子径 5 μ m

和光純薬工業製, s/n LAE6721

⑤TSK-GEL Octyl-80Ts, 粒子径 5 μ m

東ソー製, s/n 17345

⑥Inertsil C8-3, 粒子径 5 μ m

GL Science 製, s/n 1J113637

⑦Sunfire C8 5 μ m, 粒子径 5 μ m

Waters 製, s/n 0112312771

⑧XBridge C8 5 μ m, 粒子径 5 μ m

Waters 製, s/n 0111320301

⑨Inertsil C8-4, 粒子径 5 μ m

GL Science 製, s/nIF39009

⑩LiChrosorb RP-8, 粒子径 10 μ m

GL Science 製, s/nJL61008

4. 標準品 THI-DNPH の合成

公定書の 10 分の 3 のスケールで標準品を合成し, 標準溶液を調製した (スキーム 1)。

5. 検液の調製

公定書の方法で製品から検液を調製した (スキーム 2)。

6. HPLC 分析条件

検出器の測定波長: 200–500nm

カラム温度: 常温

移動相: 0.1mol/L リン酸/メタノール混液

流量: 0.8 mL/min

C. 結果

(1) 組成比と定量値の関係

カラム⑤ (TSK-GEL Octyl-80Ts) を用いて溶媒組成比の検討を行った。標準液として 20 μ g/mL THI-DNPH を用い, 検液は H23-5A から調製した。この試料は予備検討により最も THI 含量が高いと判明した試料である。

図 2 に標準液の, 図 3 に検液のクロマトグラムを示した。THI-DNPH の保持時間はメタノール含量が低いほど長くなった (図 2)。検液を分析すると, 公定書の方法の溶媒比である 50:50 では THI-DNPH のピークはベースラインが大きく上昇している時間に溶出され, 直後のピークと接していた (図 3)。これと比べて 60:40 ではベースラインの上昇はわずかであった。60:40 からメタノール含量が下がって行くにつれて, 62:38 で THI-DNPH のピークの前に小さいピークが現れ, 64:36 でほぼ分離し, 66:34 と 68:32 ではベースライン分

離している。このピークを A と呼ぶ。68:32 における保持時間はピーク A が 10.4 min, THI-DNPH が 11.4 min であった。

同じ溶媒比における標準液と検液のピーク面積から検液中の THI-DNPH 濃度を求めた (表 1)。60:40 では 46 $\mu\text{g/g}$ であったのに対し、66:34 と 68:32 の溶媒比では 30~34 $\mu\text{g/g}$ であった。60:40 では不純物ピーク A と分離していないためにピークが大きく、66:34 と 68:32 ではピーク A と分離することで真の値が得られたと考えられる。

なお、50:50 では約 34 $\mu\text{g/g}$ であったが、ベースラインの上昇分が算入されていないことと不純物ピーク分を含むことが相殺されて真値に近い値になったと考えられる。62:38 で 32 $\mu\text{g/g}$ であったのは隣のピークを含まないため、64:36 で 30 $\mu\text{g/g}$ であったのはベースラインが水平でないためと考えられる。

(2) 組成比とスペクトルの関係

クロマトグラム上のピークのピークトップにおける波長スペクトルを観察した (図 4)。標準液ではいずれの溶媒比においても THI-DNPH ピークは吸収極大波長が 385 nm であった。溶媒比 68:32 で分離した検液における THI-DNPH ピークとピーク A の波長スペクトルを観察した。すると、THI-DNPH のピークは吸収極大波長が 384 nm であったのに対し、不純物ピークは 359 nm であった。

さらに検液の THI-DNPH ピークの波長スペクトルを溶媒比の異なる分析条件間で比較した (表 1)。ピーク A と十分分離していない 62:38 および 64:36 では 382~383 nm であったが、68:32 と同様にベースライン分離している 66:34 では 384 nm であった。

(3) 異なるカラムによる分離

同じサイズの 10 種類のオクチルカラムで

分析を行った。また、同条件で分析した標準液における THI-DNPH とピーク面積を比較して検液中の THI-DNPH 含量を求めた。すると、カラム①、②および④は⑤と類似したクロマトグラムを示し、定量値も近かったが、他のカラムは⑤とは異なるクロマトグラムであり、定量値が大きいカラムもあった (図 5)。

D. 考察

検討した条件のうち、TSKgel Octyl-80Ts を用いて溶媒比 68:32 とした場合が不純物ピーク A との分離に優れていた。しかし、規格設定にあたっては、より汎用的な条件を設定する必要がある。そこで、カラムとしては従来通り 4.6 mm×250 mm オクチルカラムとし、不純物ピーク A とのピーク分離をカラムと溶媒比の選定の条件とするのがよいと考えられる。具体的には、「カラムと溶媒比は検液の THI-DNPH のスペクトルが標準液のものと同等になるものを選択する。」が良いであろう。そして、TSKgel Octyl-80Ts, 68:32 を推奨カラム及び推奨溶媒比とすることも可能であろう。

ピーク A は波長スペクトルが THI-DNPH と異なることから、DNPH 化された物質ではないと考えられる。

E. 参考文献

1) Kröplien, U., Quantitative analysis of 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole. *J. Chromatogr.*, **362**, 286-290 (1986).

F. 研究発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

資料 1. 第 8 版食品添加物公定書純度試験(9)

(9) 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 40 μ g/g 以下(固形物換算)

(i) 装置 組合わせカラム

概略は次の図による。ただし、部品の接続部は標準すり合わせガラス接続とする。

A: 滴下漏斗(100ml)

B: テフロン製コック

C: ガラスカラム 内径 12.5mm, 長さ 150mm (接続部分を含む)又は内径 10mm, 長さ 200mm(接続部分を含む)

D: 弱酸性陽イオン交換樹脂(微粒)

E: 綿栓

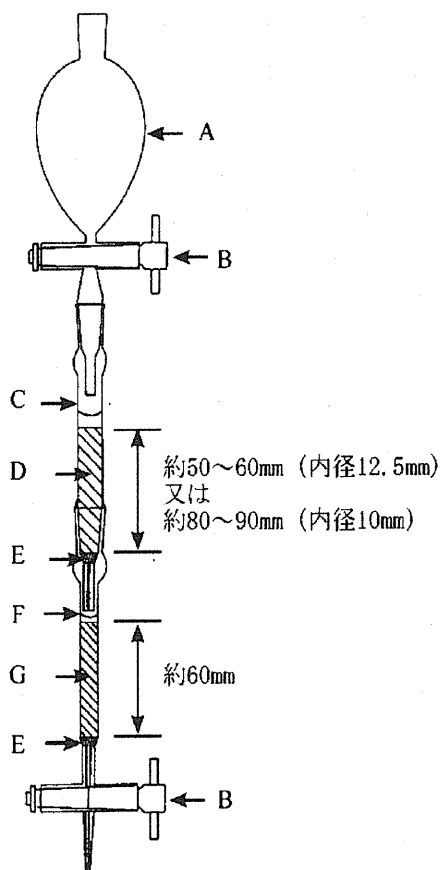
F: ガラスカラム 内径 10mm, 長さ 175mm (接続部分を含む)

G: 強酸性陽イオン交換樹脂(微粒)

(ii) 操作法

本品 0.20~0.25g を精密に量り、水 3ml を加えて溶かし、試料液とする。試料液を組合わせカラムの上側のカラム C に定量的に移す。

カラムを水約 100ml で洗浄する。上側のカラム C を外し、滴下漏斗 A を下側のカラム F に接続した後、カラム F を 0.5mol/L 塩酸溶液で溶出する。最初の溶出液 10ml を捨て、その後に溶出液 35ml を集める。その溶液を 40 $^{\circ}$ C, 2.0kPa で乾燥状態まで濃縮する。そのシロップ状の残留物をカルボニル基除去メタノール 250 μ l で溶解し、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩試液 250 μ l を加える。その反応混合物をセプタムキャップ付きのガラス瓶に移し室温で 5 時間保管し、検液とする。別に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 0.50g を塩酸 1ml に加えてかくはんした後、エタノール 10ml を加えて、水浴上で溶液になるまで加熱する。2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 0.1g をその熱い溶液に加える。数分で 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの結晶化が始まり、室温まで冷却し結晶化が完全になったら、ろ過分離する。この 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをエタノール 5ml 当たり塩酸 1 滴を加えたエタノールから再結晶することにより精製する。精製した結晶をろ過分離し、デシケーター中で乾燥する。この約 0.01g を精密に量り、カルボニル基除去メタノールで正確に 100ml とする。この溶液をカルボニル基除去メタノールで希釈して、0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml の標準液を調製する。検液及び標準液をそれぞれ 5 μ l ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの標準液



のピーク面積を測定し、検量線を作成する。検液のピーク面積を測定し、検量線を用いて2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの量を求める。ただし、2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン 100 μ g/ml は2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 47.58 μ g/ml に相当する。

操作条件

検出器 紫外吸光光度計(測定波長 385nm)

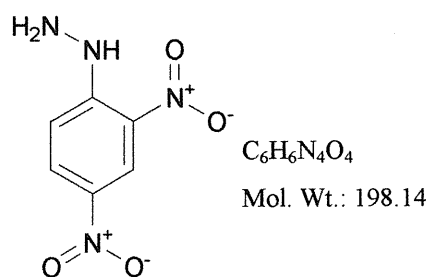
カラム充てん剤 10 μ m の液体クロマトグラフィー用オクチルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4.6mm, 長さ 25cm のステンレス管

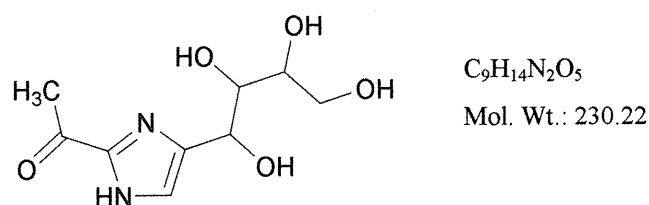
カラム温度 常温

移動相 0.1mol/L リン酸/メタノール混液(1:1)

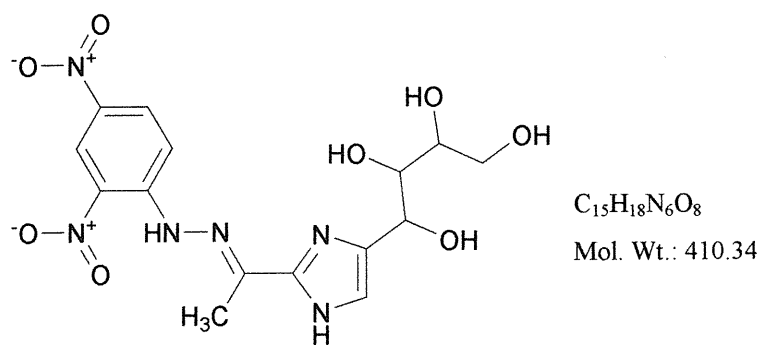
流量 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの保持時間が 6.3 \pm 0.1 分となるように調整する。



2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)



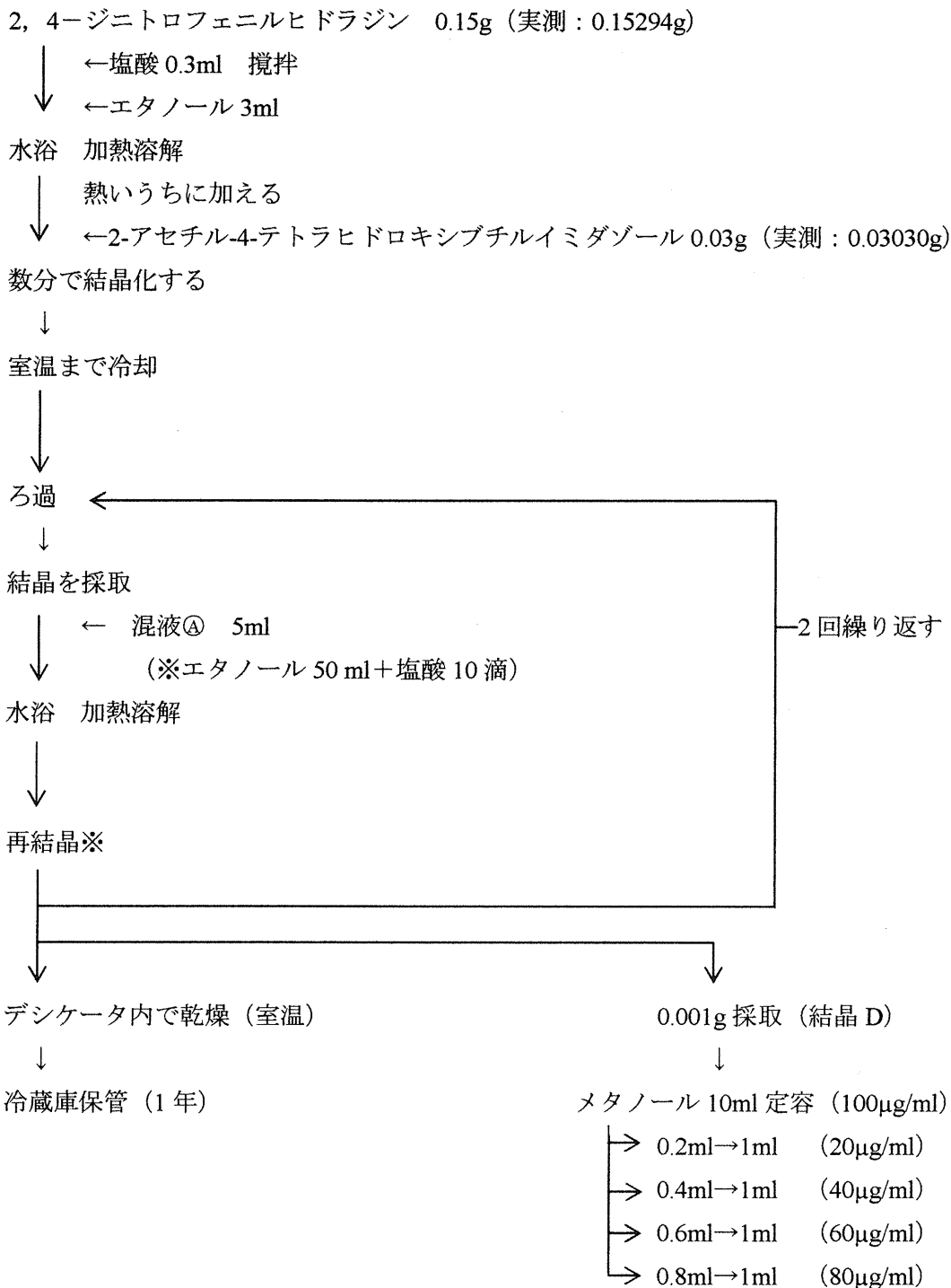
2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI)



2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole 2,4-dinitrophenylhydrazone (THI-DNPH)

図 1. DNPH, THI および THI-DNPH の構造

スキーム 1. 標準品の調製



※再結晶

混液④から再結晶を行い、精製度の高い結晶 D (0.02180g) 及び DNPH を含む結晶 C (0.01376g) を得た。

スキーム 2. 検液の調製

試料 0.20~0.25g

↓ ←D.W.3ml

試料液

上部カラム(D)に付加

↓ ←D.W.100ml Wash

上部カラム(D)をはずす

↓ ←0.5mol/L 塩酸 45ml Elute

初めの 10ml は捨てる

その後の 35ml を集める

↓

エバポーターで濃縮 40℃ 12.0mmHg

↓

メタノール 0.25ml で溶解

↓ ←2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩試液 0.25ml

セプタムキャップ付きのガラス瓶で保存 (室温 5hr.)

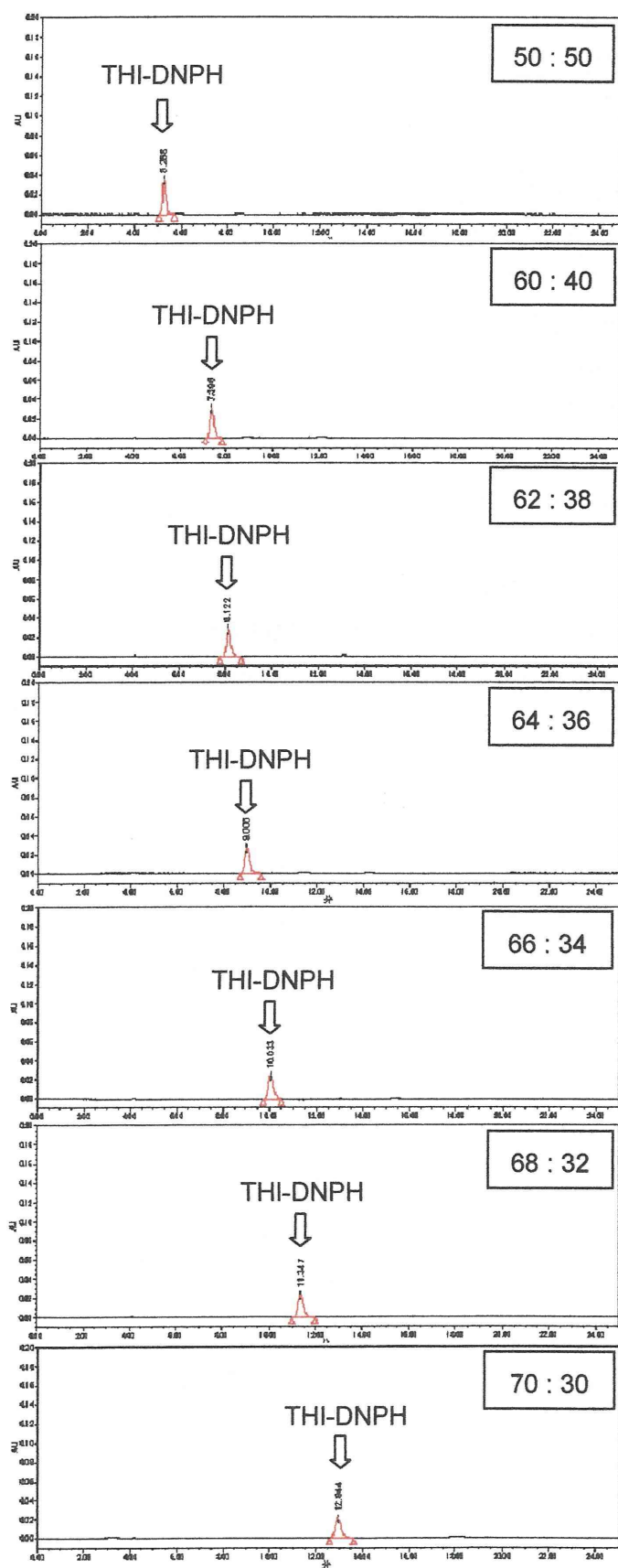


図2. 標準液のクロマトグラム. カラム: TSK-GEL Octyl-80Ts, 4.6 mm I.D. × 250 mm. 0.1mol/L リン酸 / メタノール混液の組成比をそれぞれのクロマトグラムに示した. THI-DNPH のピークを矢印で示した.

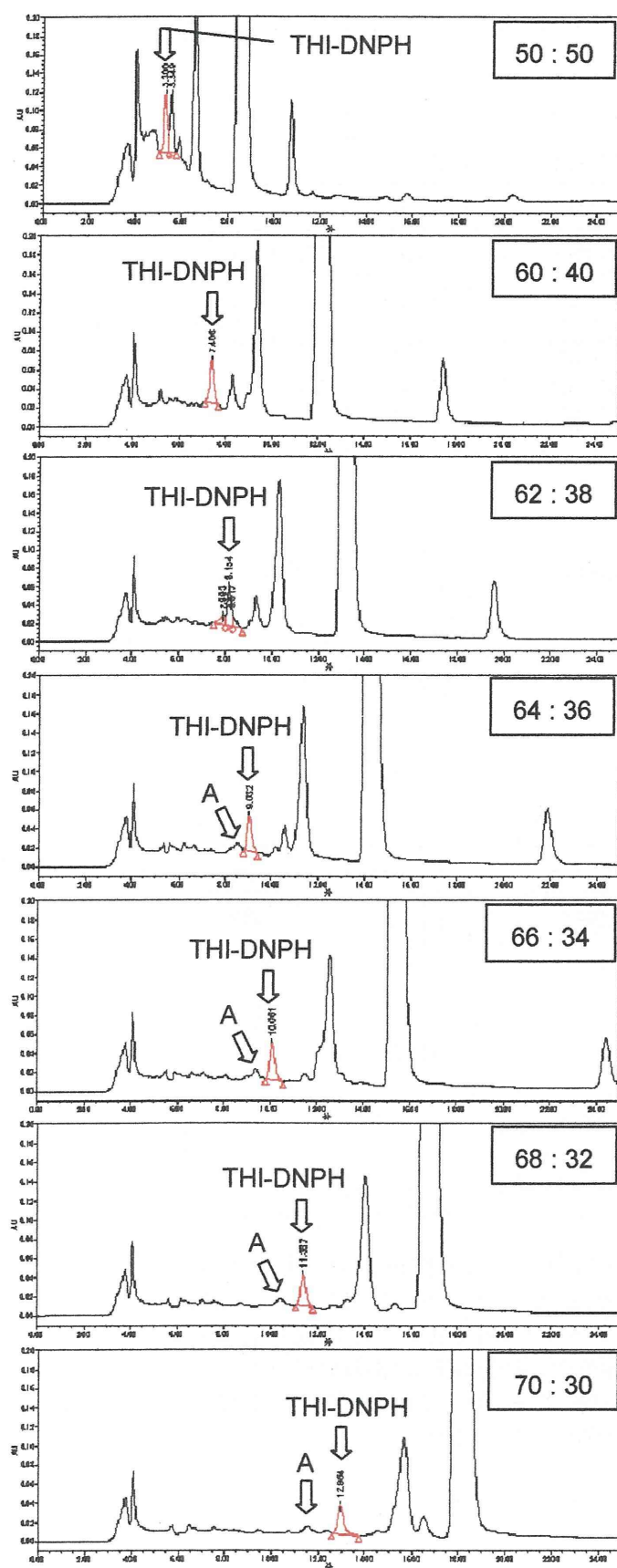


図 3. 検液のクロマトグラム. カラム : TSK-GEL Octyl-80Ts, 4.6 mm I.D. × 250 mm. 0.1mol/L リン酸/メタノール混液の組成比をそれぞれのクロマトグラムに示した. THI-DNPHと不純物Aのピークを矢印で示した.

表 1. THI-DNPH ピークの保持時間, 定量値と吸収極大波長.

溶媒比	保持時間	定量値	吸収極大
50 : 50	5.30 min	34.39 μ g/g	
60 : 40	7.41 min	45.50 μ g/g	
62 : 38	8.15 min	31.59 μ g/g	382.8 nm
64 : 36	9.03 min	30.46 μ g/g	381.6 nm
66 : 34	10.06 min	34.40 μ g/g	384.0 nm
68 : 32	11.39 min	29.83 μ g/g	384.0 nm
70 : 30	12.96 min	32.77 μ g/g	

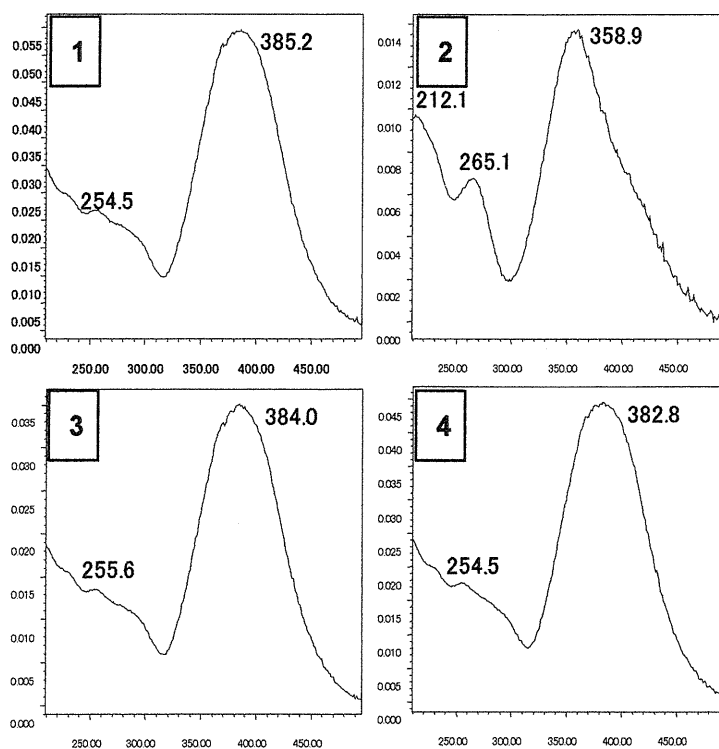


図 4. THI-DNPH およびピーク A の波長スペクトル. カラム: TSK-GEL Octyl-80Ts, 4.6 mm I.D. \times 250 mm. 溶媒: 0.1mol/L リン酸/メタノール混液. 1: 標準液における THI-DNPH. 2: 溶媒比 68:32 で分離した検液のピーク A. 3: 溶媒比 68:32 で分離した検液の THI-DNPH. 4: 溶媒比 62:38 で分離した検液の THI-DNPH.