

ガスクロマトグラフィーにおける含フッ素カルボニル試薬の開発と応用

小林 恵子¹⁾，河合 聡¹⁾

岐薬紀要 (1983) 32 : 15-19

要約：Pentafluorophenylhydrazine (PFPH) と O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine (PFBOA) は水溶性低分子カルボニル化合物のガスクロマトグラフィー (GC) 用縮合試薬としてすぐれた性質を有している。カルボニル化合物と PFPH あるいは PFBOA との縮合反応は室温で速やかに進行し，生成物は有機溶媒に容易に抽出され，過剰の試薬は簡単に除去できる。誘導体は有機溶媒中で安定であり，高い揮発性を有するため低温での GC 分離が可能であり，また電子捕捉検出器に高感度である。縮合反応により *syn*-, *anti*- 異性体を形成するため2つのピークを与えるカルボニル化合物もある。PFPH に比べ PFBOA の方がすぐれており，誘導体化が短時間で進行し，揮発性がより高いという利点を持つ。PFPH と PFBOA はカルボニル化合物の微量分析に用いられている。

索引用語：ガスクロマトグラフィー，含フッ素カルボニル試薬，ペンタフルオロヒドラジン，ペンタフルオロベンジルオキシアミン，誘導体化 (文23)

Development and Application of Fluorine-Containing Reagent in Gas Chromatography of Carbonyl Compounds

KEIKO KOBAYASHI and SATOSHI KAWAI

Ann. Proc. Gifu Coll. Pharm. (1983) 32 : 15-19

Abstract : Pentafluorophenylhydrazine (PFPH) and O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine (PFBOA) have been found to be excellent as a derivatizing agent in the gas chromatographic (GC) determination of low-molecular-weight carbonyl compounds in aqueous solution. The reaction of carbonyl compounds with PFPH or PFBOA proceeds readily at room temperature to yield derivatives extractable from the aqueous solution with organic solvents, and the complete removal of the unreacted reagent is easily achieved. The resulting derivatives are stable in organic solvents and very volatile, and therefore the GC separation can be carried out at low temperatures. Also, the derivatives are extremely sensitive towards the electron capture detector. Some carbonyl compounds react with PFPH or PFBOA to show two peaks corresponding to *syn*- and *anti*- isomers resulting from condensation reactions with them. The utility of PFBOA is compared with that of PFPH. The formation of the PFBOA-derivatives is much more easily achieved than that of the corresponding PFPH-

1) 岐阜薬科大学薬品分析化学教室
岐阜市三田洞東5丁目6-1
1) Department of Pharmaceutical Analytical
Chemistry, Gifu College of Pharmacy,
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 28, 1983
The Annual Proceedings of Gifu College of
Pharmacy,
ISSN 0434-0094, CODEN : GYDKA 9

derivatives. The PFBOA-derivatives are also much more volatile than the corresponding PFPH-derivatives, and therefore the GC separation can be carried out at lower temperature. PFPH and PFBOA have been applied to the micro-determination of various kinds of carbonyl compounds.

Keyphrases : gas chromatography, fluorine-containing carbonyl reagent, pentafluorophenylhydrazine, O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine, derivatization (Ref 23)

ガスクロマトグラフィー (GC) は誘導体調製試薬が開発されることにより発展してきた。誘導体調製の目的は化合物を揮発性に変え、熱安定性を増し熱分解を防ぎ、検出器に対する感度を増加させることなどにあり、誘導体化反応は定量的に進行し、目的生成物と過剰試薬との分離が容易であることが望ましい。GC 用カルボニル試薬としては methylhydroxylamine, butylhydroxylamine, benzyloxylamine, hydroxylamine, 2, 4-dinitrophenylhydrazine などが用いられてきたが、これらの試薬との反応はほとんど有機溶媒中で進行し揮発性も低く、微量分析にも難点があり、とくに生体成分の微量分析のために水溶液中でも簡単に反応が進行する誘導体化試薬の開発が望まれた。こうした要望に応じて登場したのが pentafluorophenylhydrazine ($C_6F_5-NHNH_2$: PFPH)¹⁾ と O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine ($C_6F_5-CH_2ONH_2$: PFBOA)^{2,3)} である。本報はすぐれた GC 用カルボニル試薬である PFPH と PFBOA を取り上げ、それらの具体的応用例を紹介したい。

1. 含フッ素カルボニル試薬の利点

含フッ素カルボニル試薬である PFPH と PFBOA は GC 用縮合試薬として多くの利点を有している。

1) 水溶液中でカルボニル基との縮合反応が容易に進行する。生体成分の多くは一般に極性が高く水溶性で有機溶媒に抽出されにくい。これら水溶性化合物が水溶液のまま反応し、有機溶媒に抽出可能な誘導体に誘導できる試薬の開発はきわめて有用である。低分子のアルデヒド、ケトン、ケト酸などの水溶性カルボニル化合物に対して PFPH と PFBOA はすぐれた誘導体化試薬である。

2) PFPH および PFBOA との誘導体は、有機溶媒によって容易に抽出される。0.2-0.3ml という少量の有機溶媒によつて目的成分の有効な濃縮操作も兼ねることになる。ことに無極性溶媒ヘキサンによつても抽出可能なため、水溶性試料中に共存した種々の共存妨害物質を除去する目的も達せられることも見逃せない利点である。

3) 過剰の PFPH や PFBOA は、酸性条件下で有機溶媒抽出することによって除くことができる。このことから高濃度の試薬の使用が可能であり、GC 分析に支障を生じない。

4) 生成誘導体はきわめて揮発性である。したがって、低い温度での GC 分離が可能である。このことは、難揮発性化合物の GC を可能にすることを意味する。PFPH と PFBOA が当初ケトステロイド類の GC 用縮合試薬として開発された理由である。

5) 生成誘導体は電子捕捉検出器 (ECD) にきわめて高感度である。この性質のため pg ($10^{-12}g$) レベルの定量が可能であり、生体成分の超微量分析に適している。

2. 水溶性低分子カルボニル化合物の GC への応用に関する基礎研究

Hoshika および Muto⁴⁾ は27種類の低級脂肪族カルボニル化合物と PFPH の縮合生成物の t_R と反応率を報告した。彼らの縮合反応はメタノールという非水溶媒中で行われたが、著者らは C_1-C_6 の13種類のアルデヒドおよびケトンに中性水溶液中で PFPH を反応させ、PFPH とカルボニル化合物の縮合反応は水溶液中でも容易に進行することを初めて明らかにした⁵⁾。さらに、PFBOA との縮合反応⁶⁾ は弱酸性 (pH 4-6) で一層進行しやすく、生成物はより揮発性で、PFPH の場合より30°C低いカラム温度でほぼ等しい t_R が得られることも明らかにされた。縮合

の反応性については、アルデヒドとの反応は短時間で進行するが、ケトンは分子が大きくなるに従い反応は進行しにくくなる。PFPH と PFBOA との比較では、PFBOA の方が高い反応性を示し、生成物も安定である。PFPH、PFBOA の唯一の欠点は、非対称のカルボニル化合物に対し *syn-*、*anti-* 異性体の形成に基づく 2 本のピークを与えることである。しかし、主ピークを利用した検量線は反応条件を一定に保てば原点を通る直線性を示す。

3. 応 用

3-1 steroid, prostaglandin その他の GC への応用

血中の steroid ホルモン濃度は非常に低く、GC 分析による微量定量を目的として PFPH による誘導体化が Attal ら¹⁾により初めて検討された。血中 estrone を PFPH とメタノール・酢酸溶液中で反応させ、ECD を用いて 1 ng の estrone 測定が可能となり、特異性の高い微量定量法が確立された。同じく PFPH を用いて estrone と estradiol の同時定量が行われ⁷⁾、血漿中 20 pg の estradiol の検出が可能となった。

PFBOA を用いた例としては Koshy ら⁸⁾が 3-, 17-, 20- の monoketo, 3, 17 と 3, 20 の diketo など 11 種の keto steroid について、keto 基の選択的 oxime 化を検討した。縮合反応はピリジン中 65°C、30 分間行いシクロヘキサンで抽出し、230-250°C で GC 分離を行い、testosterone の 0.1 ng まで高感度に測定された。操作は簡単であり誘導体は熱にも安定だが、3-keto steroid から *syn-*、*anti-* 異性体が生じるため、薄層クロマトグラフィーを併用する分離法を工夫している。ヒト血漿中の 17-keto 基を持つ dehydroepiandrosterone の定量²⁾に適用した例では、8 種類の steroid について、ピリジン中 60°C、1h、PFBOA と反応させた後、過剰試薬を除去するため酸性下へキサンで抽出し、*t_R* がもとめられた。11位の keto 基は立体障害により PFBOA と反応せず、3位の OH 基は trimethylsilyl 化された。検量線は 0.6-3.0 ng まで直線性を示し、回収率、再現性は良好であった。生体試料中の prostaglandin と thromboxane を PFBOA と反応させ、250°C で分離した例⁹⁾もあり、ECD に高感度なことから測定は pg まで可能となった。同様に PFBOA で誘導体化後、trimethylsilyl 化する方法が生物試料中の prostaglandin の分析に応用され、同定はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) により行われた¹⁰⁾。本分析法は 30 pg までの検出が可能であり、生物試料中の各部位の prostaglandin 測定と linoleic acid 投与後のラット器官中の thromboxane の生成量の測定に応用された。抗ウイルス性薬剤である arildone の尿、血漿中の分析法¹¹⁾が報告され、エタノール・氷酢酸中 PFBOA と 90°C、90 分反応後へキサン抽出、275°C で GC により分離されている。尿中 1.4 ng/ml、血漿中 6.4 ng/ml まで測定が可能で、検量線・再現性はともに良好であった。 β -diketone 基から *cis-*、*trans-* 異性体が生成するが、短いカラムを用い単一ピークとして測定されている。ヒト血清中の抗潰瘍薬 geranylgeranylacetone の高感度測定¹²⁾にも PFBOA は応用され、ピリジン中 60°C、2h 反応させへキサン抽出後 270°C で GC 分離する方法が報告されている。この場合、*cis-*、*trans-* の *syn-*、*anti-* 異性体を生成するため 4 つのピークを与え、GC-MS のフラグメントイオン *m/z* 320 のピーク強度を比較すると、*cis* 体の *anti-* 異性体は *syn-* 体より 8 倍の強さを示した。測定は 1 ng/ml まで可能であり、pharmacokinetic へ応用された。

3-2 水溶性低分子カルボニル化合物の GC への応用

水溶液中の低分子アルデヒドまたはケトンの GC への応用^{5,6)}についてはすでにふれたが、 α -keto 酸の GC に PFPH¹³⁾ および PFBOA¹⁴⁾ を応用する場合は誘導体化後、さらにジアゾメタンによりカルボキシル基がメチル化された。8 種類の α -keto 酸が PFBOA と水溶液中室温、30 分で反応し、130°C で GC 分離されている¹⁴⁾。この場合も *syn-*、*anti-* 異性体の生成に基づく double peak が観察されるが、ECD 測定により縮合物として 10 pg まで検出でき、再現性は良好であった。

水溶液中の HCHO と PFBOA の反応性は特に高く、縮合反応は速やかに進行し、縮合生成物は GC 分析が可能なことから衣類中の遊離 HCHO の分析に精度よく応用された¹⁵⁾。その縮合生成物は鋭い単一ピークを示し、ECD にきわめて高い感度を示すため、次節以降で紹介されるように、HCHO を生成する種々の反応にこの手法はきわめて有用である。

3-3 化学反応の利用

適当な化学反応によりカルボニル基を生成する化合物は、PFBOA との反応を組合せ GC により測定することができる。鎮咳剤として広く用いられている *guaiacol glyceryl ether*(GGE) は過ヨウ素酸酸化により HCHO と 2-methoxyphenoxyacetaldehyde (MPA) を生成するが、この反応を利用し、水溶性の大きい GGE の GC 測定に PFBOA が有効に適用された¹⁶⁾。10分間過ヨウ素酸酸化後、PFBOA と縮合させ、80°, 190°C と GC の分離温度を変えることにより HCHO と MPA との両者の定量が可能であった。MPA は *syn-*, *anti-* に由来する 2 本のピークを与えるが、血中 GGE の分析など HCHO 測定がグルコースの共存により大きな影響を受ける場合は、MPA を測定する方が共存グルコースの妨害も少なく、実用性が高いと思われる。

3-4 酵素活性の測定

酵素反応の生成物を測定することにより、その酵素活性を測定することができる。その例として *monoamine oxidase* (MAO) 活性測定への応用がある。その 1 例は混合基質の利用¹⁷⁾ であり、*benzylamine* (BA) および *β -phenyl ethylamine* (PEA) は、MAO により *benzaldehyde*, *phenylacetaldehyde* をそれぞれ生成する。BA と PEA との混液にミトコンドリア分画の MAO を作用させ、生成物をエタノール・酢酸中 PFPH と室温で 1h 反応後、縮合物は 190°C で GC により分離測定した。他の 1 例¹⁸⁾ は MAO 反応から生成する H₂O₂ に着目し、メタノール共存下 *catalase* の作用で HCHO に変え、これを PFBOA と縮合させて ECD-GC 分析を行うものであり、この方法を利用すれば MAO 活性測定にあらゆる種類の基質を使用することが可能である。また、*pyruvic acid* (PA), *oxaloacetic acid* (OAA), *α -ketobutyric acid* (α -KBA), *α -ketoglutaric acid* (α -KGA) を定量することにより *L-glutamate dehydrogenase* (GLDH) と *aminotransferase* の活性が測定されている¹³⁾。PA と α -KBA は *syn-*, *anti-* 体、 α -KGA は *cyclization* 化合物を作るため 2 つのピークを生じるが、ピークの和を測定し α -keto 酸 2 nmol まで検出されている。GLDH 活性については、生成物の α -KGA を pH 9 で PFPH 反応させることにより *microunit* までの活性が測定されている。血清 0.2ml 中の GOT および GPT の酵素活性も測定¹³⁾ されている。本法は比色法などに比べ 1/10 の基質量で正確な測定が可能である。この応用として *cystathionine*, *homoserine* を基質とし *cystathionase* により生成した α -KBA を測定¹⁹⁾ することにより、*cystathionase* の活性、それぞれの *K_m* 値、*V_m* 値がもとめられ、生物試料中の酵素活性を測定したところラットの肝臓・腎臓において *cystathionase* の高い活性値を示した。同様の方法で試料 0.25ml 中 5 nmol までの *L-cystathionine* の測定が可能である¹⁹⁾。

3-5 酵素反応を利用した測定

生体成分の分析において特定酵素を作用させ、その生成物を PFBOA との縮合反応と結びつけることにより測定しようとする生体成分の微量定量法が検討された。制ガン因子として注目されている *D-amygdalin* は *β -glucosidase* により水解され *benzaldehyde* を遊離するため、PFBOA 縮合体として感度よく GC 分析が行われた²⁰⁾。FID では 100ng, ECD は 10pg の注入による *D-amygdalin* の測定が可能である。

H₂O₂ はメタノール存在下、*catalase* の作用で対応量の HCHO を生成するので、生成した HCHO を PFBOA と反応させ、GC 分析することにより H₂O₂ の新しい測定法が考案された²¹⁾。本法は弱酸性で *catalase* 反応が進

むため、PFBOA を最初から加え 37°C、30分間反応させ、catalase 反応と PFBOA 縮合反応を同時に行い、縮合生成物はヘキサン抽出後、80°Cで GC で分離が可能であった。ECD により試料 1 ml 中 H₂O₂ 10ng までの測定が可能となり、アスコルビン酸など共存還元性物質の影響をほとんど受けないことが本法の利点の一つである。さらに、ヘキサン抽出ができるため、血清中や尿中の共存物質の妨害を受けないことも本法の利点である。本法は血清中の glucose²²⁾、uric acid²³⁾ の定量に応用することができ、酵素として glucose oxidase または uricase を作用させ生成した H₂O₂ を HCHO として測定した。PFBOA は最初から加え、oxidase 反応、catalase 反応、縮合反応の 3つの同時反応が可能であるため、操作は簡単であり、少ない血清試料で微量分析が可能となった。

4. 今後の展望

GC のカルボニル誘導体化試薬としてフッ素を含んだ PFPH、PFBOA について述べた。非水溶媒中での誘導体化が多いことから水溶性試薬の開発が望まれてきたが、PFPH、PFBOA はそれらの要望に充分応えたものであり、特に PFBOA は反応性と揮発性にすぐれ、酵素反応と関連させた生体成分の超微量定量法について、今後ますます広い分野への応用が期待される。

引用文献

- 1) J. Attal, S. M. Hendeles, K. B. Eik-Nes, *Anal. Biochem.*, **20**, 394 (1967).
- 2) T. Nambara, K. Kigasawa, T. Iwata, M. Ibuki, *J. Chromatogr.*, **114**, 81 (1975).
- 3) G. A. Youngdale, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 625 (1976).
- 4) Y. Hoshika, G. Muto, *J. Chromatogr.*, **152**, 224(1978).
- 5) K. Kobayashi, M. Tanaka, S. Kawai, T. Ohno, *ibid.*, **176**, 118 (1979).
- 6) K. Kobayashi, M. Tanaka, S. Kawai, *ibid.*, **187**, 413 (1980).
- 7) R. A. Mead, G. C. Haltmeyer, K. B. Eik-Nes, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 554 (1969).
- 8) K. T. Koshy, D. G. Kaiser, A. L. Van Der Slik, *ibid.*, **13**, 97 (1975).
- 9) F. A. Fitzpatrick, M. A. Wynalda, D. G. Kaiser. *Anal. Chem.*, **49**, 1032 (1977).
- 10) J. Mai, S. K. Goswami, G. Bruckner, J. E. Kinsella, *J. Chromatogr.*, **230**, 15 (1982).
- 11) G. B. Park, P. Erdtmansky, M. P. Kullberg, J. Edelson, *ibid.*, **222**, 213 (1981).
- 12) M. Tanaka, J. Hasegawa, J. Tsutsumi, T. Fnjita, *ibid.*, **231**, 301 (1982).
- 13) S. Ohmori, Y. Tanaka, M. Ikeda, K. Hirota, *Anal. Biochem.*, **112**, 204 (1981).
- 14) K. Kobayashi, E. Fukui, M. Tanaka. S. Kawai, *J. Chromatogr.*, **202**, 93 (1980).
- 15) 小林恵子, 岡本光美, 河合 聡, *分析化学*, **30**, 76 (1981).
- 16) 小林恵子, 岡本光美, 河合 聡, *薬誌*, **102**, 1095 (1982).
- 17) A. Uji, S. Kawai, T. Nagatsu, *J. Chromatogr.*, **221**, 155 (1980).
- 18) K. Kobayashi, S. Kawai, T. Nakano, T. Nagatsu, *ibid.*, **274**, 313 (1983).
- 19) S. Ohmori, S. Mizuno, M. Ikeda, K. Yao, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2099 (1982).
- 20) S. Kawai, K. Kobayashi, Y. Takayama, *J. Chromatogr.*, **210**, 342 (1981).
- 21) K. Kobayashi, S. Kawai. *ibid.*, **245**, 339 (1982).
- 22) K. Kobayashi, S. Kawai, *ibid.*, **275**, 394 (1983).
- 23) 小林恵子, 成田伸子, 河合 聡, 窪田種一, 日本薬学会第103年会(東京)講演要旨集, P 535.