

4-ヒドロキシ酪酸ナトリウムのTMS誘導体化について

村瀬 佑一*, 廣瀬 達也*

Derivatization of 4-hydroxybutyric acid sodium salt

Yuichi MURASE* and, Tatsuya HIROSE*

*Osaka Customs Laboratory 4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031 Japan

Due to its low volatility, it is difficult to analyze 4-hydroxybutyric acid sodium salt by gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) which is useful for analysis of drugs. Also, the salt easily forms a cyclic ester called γ -butyrolactone. Trimethylsilyl (TMS) derivatization is widely used as an easy method of GC-MS measurement because it protects functional groups and lowers the boiling point. Therefore, TMS derivatization is an effective means for analyzing GHB-Na by GC-MS. In this study, we determined TMS reagents and conditions for simple TMS derivatization of GHB-Na, and found it was possible to form TMS derivative from GHB-Na aqueous solution by TMS-PZ Kit and TMCS.

1. 緒 言

2. 実 験

4-ヒドロキシ酪酸(別名: γ -ヒドロキシ酪酸, 以下「GHB」という.)及びその塩類は, 麻薬, 麻薬原料植物, 向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令において麻薬に指定されている。

GHB及びGHB-Naの分析方法については, 室井らによりガスクロマトグラフ・質量分析計(以下「GC-MS」という.)を用いた手法が報告されている¹⁾。GHBは, ラクトン型である γ -ブチロラクトン(以下「GBL」という.)に変化しやすい性質を有し, また, 揮発性が低いことから, GC-MSによる検出ができないため, 室井らは, GHB及びGHB-Naをトリメチルシリル(以下「TMS」という.)誘導体とした。TMS化剤として, Trimethylchlorosilaneを10%含有するN,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide溶液を用い, GHB-NaをTMS化する条件として, 室温でTMS化剤を加えることでTMS化することが好ましいと報告している。

TMS化は, 水酸基やカルボキシル基等を保護し, 分子の極性を下げることで揮発性を高めることができることから, GC-MSによる分析では広く用いられており, 様々なTMS化剤が開発されている²⁾。そこで, 本研究においては, GHB-NaのTMS化をより簡便に行うため, TMS化剤及び反応条件について検討を行った。

また, GHB-Naの水溶液については, TMS化剤及びTMS誘導体は, 水により容易に加水分解されるため, 一度水溶液を蒸発させ, GHB-Naを乾固してからTMS化する必要がある。そこで, GHB-Naを水溶液の状態でTMS化することが可能であるか, 検討を行った。

2.1 試 薬

2.1.1 TMS化剤

N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (以下「MSTFA」という.)
(シグマアルドリッチ)

Trimethylchlorosilane (以下「TMCS」という.) (キシダ化学)

N-Trimethylsilyl-imidazole (以下「TMSI」という.) (東京化成工業)

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (以下「BSTFA」という.)
(和光純薬工業)

N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (以下「BSA」という.)
(和光純薬工業)

N-(Trimethylsilyl)dimethylamine (以下「TMSDMA」という.)
(東京化成工業)

1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane (以下「HMDS」という.)
(東京化成工業)

TMS-PZ Kit (東京化成工業)

2.1.2 その他試薬

γ -ブチロラクトン (キシダ化学)

水酸化ナトリウム (キシダ化学)

クロロホルム (キシダ化学)

エタノール (キシダ化学)

2.2 分析装置及び測定条件

2.2.1 装置

ガスクロマトグラフ GC-2010Plus/質量分析計 GCMS-QP2020
(島津製作所製)

超音波洗浄機 (超音波振とうに使用) (オムロン松坂株式会社)

* 大阪税関業務部分析部門 〒559-0031 大阪府大阪市住之江区南港東4-11-28

2.2.2 測定条件

スプリット比 : 80:1
 注入口温度 : 310 °C
 カラム : HP-5MS (30 m×0.25 mmI.D., 膜厚 0.25 μm)
 (Agilent Technologies)
 オープン温度 : 70 °C (3 min) → (15 °C/min) → 310 °C (21 min)
 イオン化法 : 電子イオン化法 (EI)
 イオン源温度 : 230 °C

2.3 実験方法

2.3.1 GHB-Na の合成

室井らの報告¹⁾を参考に, GBL320mg に水酸化ナトリウム 148 mg 及び精製水 2 mL を加え, 95 °C で 3 時間還流したのち, エタノールで再結晶し, GHB-Na を得た.

2.3.2 GC-MS による GHB-Na 及び GBL の測定

GHB-Na 又は GBL5 mg をサンプル管に採取し, メタノール 500 μL を加え, GC-MS で測定した.

2.3.3 GC-MS による GHB-TMS 誘導体の測定

GHB-Na10mg をサンプル管に採取し, TMCS を 10 %含有する BSTFA 溶液 25 μL 及びクロロホルム 1 mL を加え, よく混合したのち, GC-MS で測定した.

2.3.4 GHB-Na の TMS 化

GHB-Na5 mg をサンプル管に採取し, TMS 化剤 500 μL を加え, よく混合したのち, (A) ~ (D) の反応条件で TMS 化を行い, GC-MS で測定した.

- (A) 超音波振とうせず, 加熱しない.
- (B) 超音波で 1 分間振とうし, 加熱しない.
- (C) 超音波振とうせず, 湯浴中 60 °C で 30 分間加熱する.
- (D) 超音波で 1 分間振とうし, 湯浴中 60 °C で 30 分間加熱する.

2.3.5 GHB-Na 水溶液の TMS 化

10 %GHB-Na 水溶液, TMS-PZ 及び TMCS を (E) ~ (G) のとおり加え, よく混合したのち, 超音波で 1 分間振とうし, GC-MS にて測定を行った.

(E) TMS-PZ1 mL をサンプル管に採取し, 10 %GHB-Na 水溶液 10 μL を加えた. なお, 本方法は, TMS-PZ Kit 付属の説明書に記載されている使用方法である.

(F) TMS-PZ500 μL をサンプル管に採取し, 10 %GHB-Na 水溶液 10 μL を加えた.

(G) TMS-PZ500 μL をサンプル管に採取し, TMCS50 μL を加え, よく混合したのち, 10 %GHB-Na 水溶液 10 μL を加えた.

3. 結果及び考察

3.1 GBL と GHB-Na の測定結果

2.3.2 により, GBL 及び GHB-Na を GC-MS で測定したトータルイオンクロマトグラムを Fig.1 に示す. いずれのトータルイオンクロマトグラムも保持時間 4.2 分に 1 本のピークが検出されたが, そのマススペクトルは, いずれも GBL のマススペクトルを示し, GHB-Na のピーク

は, 検出されなかった. (Fig.2). GHB-Na の閉環によって発生した GBL のみが検出されたものと考えられる.

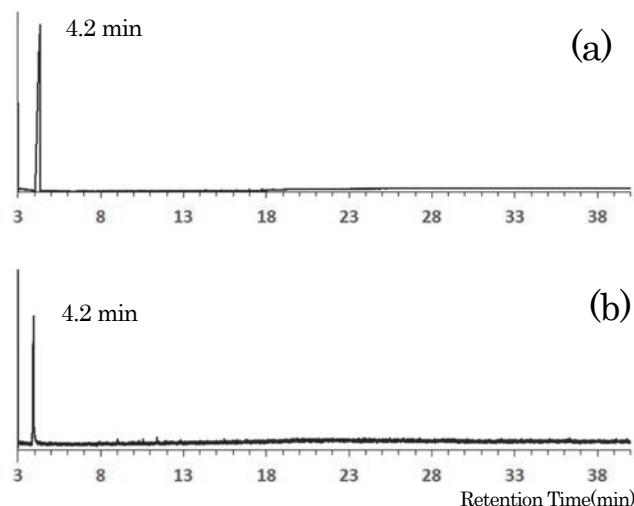


Fig.1 Total ion chromatograms of (a)GBL and (b)GHB-Na.

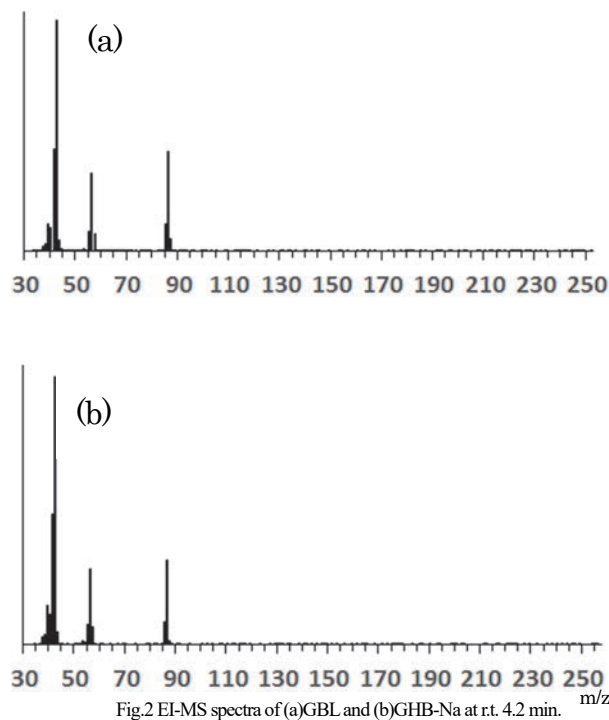
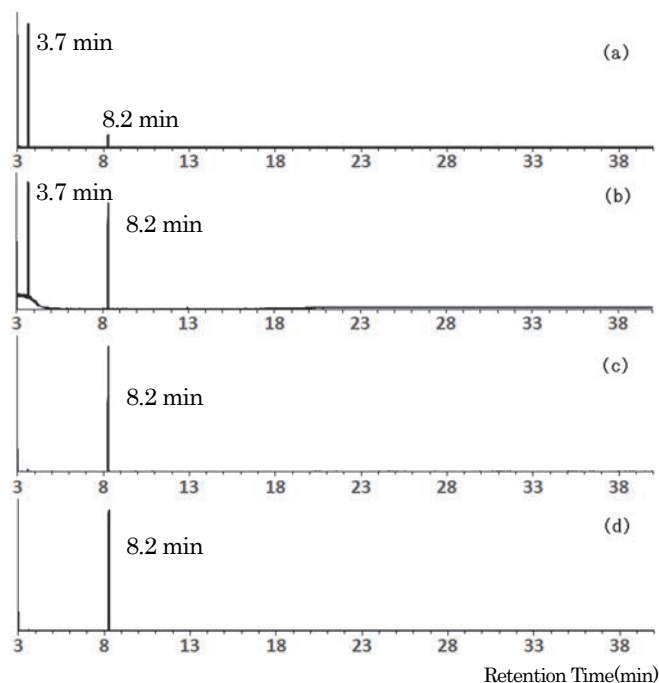
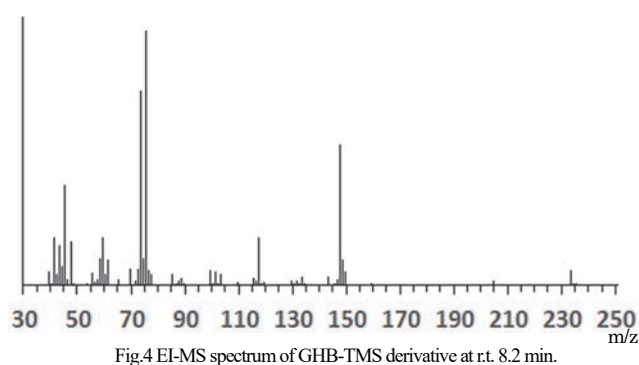
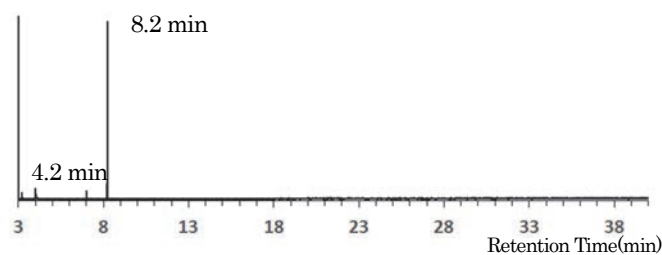


Fig.2 EI-MS spectra of (a)GBL and (b)GHB-Na at rt. 4.2 min.

3.2 GHB-TMS 誘導体の測定結果

室井らの報告¹⁾に従い, TMCS を 10 %含有する BSTFA 溶液を用いて, GHB-Na を TMS 化し, GC-MS で測定したトータルイオンクロマトグラムを Fig.3 に示す. Fig.1 と比較すると, 保持時間 8.2 分にピークが検出され, そのマススペクトルは, GHB-TMS 誘導体のマススペクトルを示した (Fig.4). また, 保持時間 4.2 分に GBL のピークが検出されたことから, GHB-Na の一部が閉環したものと考えられる.



3.3 TMS 化剤及び反応条件の検討

3.3.1 MSTFA を用いた TMS 化

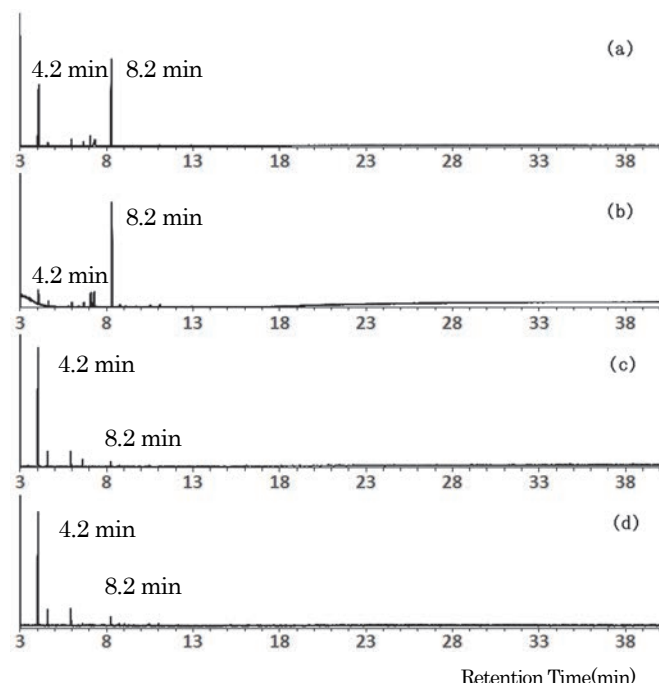
TMS 化剤として MSTFA を用いた場合のトータルイオンクロマトグラムを Fig.5 に示す。全ての反応条件において、保持時間 8.2 分に GHB-TMS 誘導体のピークと保持時間 3.7 分に MSTFA の分解物のピークが検出された。また、保持時間 4.2 分付近に GBL のピークが検出されなかったことから、GHB-Na は閉環しなかったものと考えられる。

各反応条件で GHB-TMS 誘導体と MSTFA 分解物のピーク強度を比べた場合の GHB-TMS 誘導体のピーク比は、Fig.5 (a) と Fig.5 (b) では、Fig.5 (b) がより大きいことから、超音波振とうにより TMS 化が促進されたものと考えられる。また、Fig.5 (a) 及び Fig.5 (b) と Fig.5 (c) 及び Fig.5 (d) では、Fig.5 (c) 及び Fig.5 (d) の方が大きいことから、加熱により TMS 化が促進されたものと考えられる。Fig.5 (c) と Fig.5 (d) ではピーク比に大きな違いはなかった。

3.3.2 TMCS を用いた TMS 化

TMS 化剤として TMCS を用いた場合のトータルイオンクロマトグラムを Fig.6 に示す。保持時間 8.2 分に GHB-TMS 誘導体のピークと保持時間 4.2 分に GBL のピークが検出された。このことから、GHB-Na の一部が閉環したものと考えられる。

各反応条件で GHB-TMS 誘導体と GBL のピーク強度を比べた場合の GHB-TMS 誘導体のピーク比は、Fig.6 (a) と Fig.6 (b) では、Fig.6 (b) が大きいことから、超音波振とうにより TMS 化が促進されたものと考えられる。また、Fig.6 (a) 及び Fig.6 (b) と Fig.6 (c) 及び Fig.6 (d) では、Fig.6 (c) 及び Fig.6 (d) の方が小さいことから、加熱により GHB-Na の GBL への閉環が促進されたものと考えられる。Fig.6 (c) と Fig.6 (d) ではピーク比に大きな違いはなかった。



3.3.3 TMSI, BSTFA 及び BSA を用いた TMS 化

TMS 化剤として TMSI を用いた場合のトータルイオンクロマトグラムを Fig.7(a)に示す。保持時間 7.2 分に大きな未反応の TMSI のピークと、保持時間 8.0 分と 8.2 分に分離した小さな GHB-TMS 誘導体のピークが検出された。なお、TMSI, BSTFA 及び BSA を用いた場合は、反応条件によりトータルイオンクロマトグラムは大きく変化しなかったため、これらについては、反応条件 (B) におけるトータルイオンクロマトグラフのみを示す。

TMS 化剤として BSTFA を用いた場合のトータルイオンクロマトグラムを Fig.7(b)に示す。保持時間 3.6 分に未反応の BSTFA のピークと保持時間 8.2 分に GHB-TMS 誘導体のピークが検出された。また、保持時間 4.2 分に GBL のピークが検出されたことから、GHB-Na の一部が閉環したものと考えられる。

TMS 化剤として BSA を用いた場合のトータルイオンクロマトグラムを Fig.7(c)に示す。保持時間 4.2 分と 4.6 分に未反応の BSA 及びその副生成物のピークと保持時間 8.2 分に GHB-TMS 誘導体のピークが検出された。GHB-Na の閉環の有無については、GBL のピークと BSA 及びその副生成物の各ピークが重なったため判別できなかった。

3.3.4 TMSDMA 及び HMDS を用いた TMS 化

TMS 化剤として TMSDMA 及び HMDS を用いた場合は、全ての条件において、GHB-TMS 誘導体のピークは検出されなかった。

3.3.5 GBL の TMS 化

2.3.4 の実験を、GHB-Na の代わりに GBL を用いて行ったところ、全ての TMS 化剤及び反応条件において、GHB-TMS 誘導体のピークは検出されず、GBL 及び未反応の試薬等が検出された。このことから、GHB-Na を TMS 化する反応条件下では、GBL から GHB への閉環及び TMS 化は起こらなかったものと考えられる。

3.3.6 TMS 化剤及び反応条件についての考察

MSTFA, TMCS, TMSI, BSTFA 及び BSA を用いて、GHB-Na の TMS 化が可能であることがわかった。特に、MSTFA 及び TMCS は、GHB-TMS 誘導体と副生成物等のピーク強度を比べた場合の GHB-TMS 誘導体のピーク比が大きく、GC-MS での測定が容易であった。また、超音波による振とうを行うと TMS 化が促進されること、MSTFA を用いた場合は、加熱を行うと TMS 化がさらに促進されることがわかった。

MSTFA を用いた場合の利点は、TMCS を 10%含有する BSTFA 溶液を用いた場合と比較すると、TMS 化剤の混合又は高価な混合済み試薬が必要ないことに加え、GBL への閉環が起こらないことである。このため、MSTFA を用いた TMS 化は、GHB と GBL を区別するために有用である。

TMCS を用いた場合の利点は、他の TMS 化剤に比べ非常に安価なことであるが、加熱を行うと GBL への閉環が進行すること及び水分と反応して容易に塩化水素が発生することに注意が必要である。

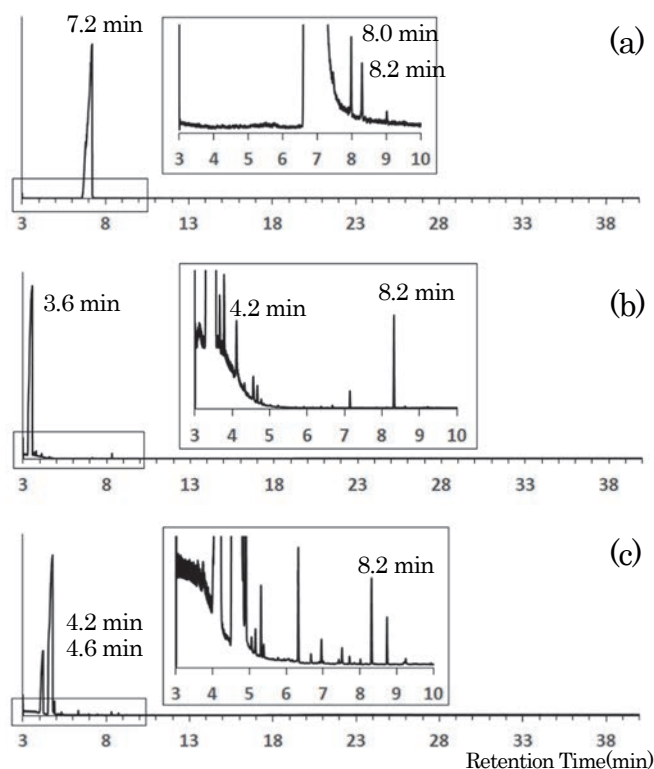


Fig.7 Total ion chromatogram of TMS derivatization of GHB-Na.

TMS Reagent:(a)TMSI, (b)BSTFA, (c)BSA

3.4 GHB-Na 水溶液の TMS 化

TMS 化剤及びその誘導体は、水により容易に加水分解されるため、通常は試料を乾燥させてから TMS 化を行う。しかし、TMS-PZ Kit (TMSI 及び無水ピリジンの混合溶液) (東京化成工業) のように、糖の水溶液に対しても TMS 化することが可能なものもある³⁾。3.3 の検討により、TMSI を用いた GHB-Na の TMS 化が可能であったことから、TMS-PZ を用いた GHB-Na の TMS 化も可能であるものと考えられる。そこで、GHB-Na 水溶液を、TMS-PZ Kit を用いて TMS 化できるか検討を行った。

2.3.5 (E) により TMS 化を行った際のトータルイオンクロマトグラムを Fig.8 に示す。保持時間 6 分から 7 分の間に TMSI のピークが検出されたことから、TMS 化剤は水により加水分解されないことがわかった。しかし、保持時間 8.2 分付近に GHB-TMS 誘導体のピークは検出されなかった。

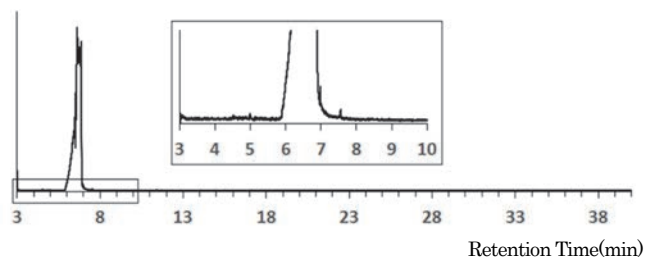


Fig.8 Total ion chromatogram of TMS derivatization of GHB-Na with TMS-PZ(condition E).

溶液中の GHB-Na の濃度を上げるため、2.3.5 (F) により TMS 化を行ったところ、溶液は 2 層に分離した。(Fig.9) それぞれの層を GC-MS で分析したところ、上層からは保持時間 4.8 分にイミダゾールのピークと保持時間 8.2 分に GHB-TMS 誘導体のピークが検出され、下層からも保持時間 8.2 分に GHB-TMS 誘導体のピークが検出された。(Fig.10) しかし、GHB-TMS 誘導体のピークは、他のピークに比べて小さいものであった。そこで、TMS 化を促進させる方法として、TMS 化剤に TMCS を加える手法が広く用いられている⁴⁾ ことから、TMS-PZ に TMCS を加えることを検討した。



Fig.9 Photo of two-phase separation of TMS-PZ when 10% GHB-Na solution was added.

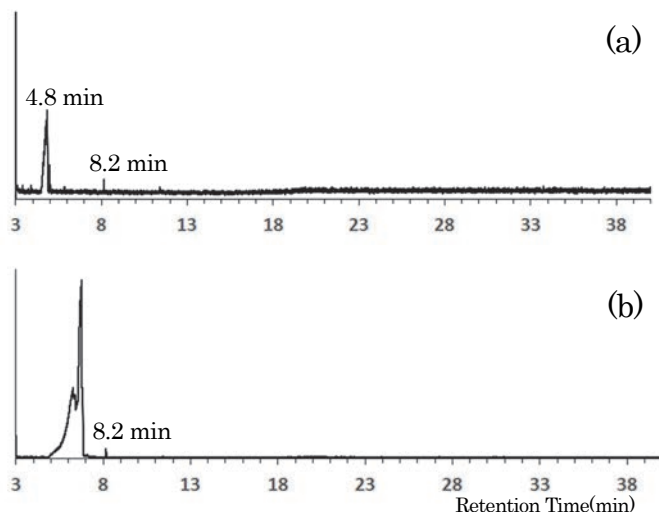


Fig.10 Total ion chromatogram of TMS derivatization of GHB-Na with TMS-PZ(condition(F)). (a)upper layer(b)lower layer

2.3.5 (G) により TMS 化を行ったところ、溶液は 2 層に分離した。それぞれの層を GC-MS で分析したところ、上層からは保持時間 6.6 分に TMSI のピークと 2.3.5 (F) に比べて大きな GHB-TMS 誘導体のピークが検出された。しかし、下層からは GHB-TMS 誘導体のピークは検出されなかった。(Fig.11)

以上のことから、TMS-PZ に TMCS を加えることにより、GHB-Na 水溶液が TMS 化されることがわかった。

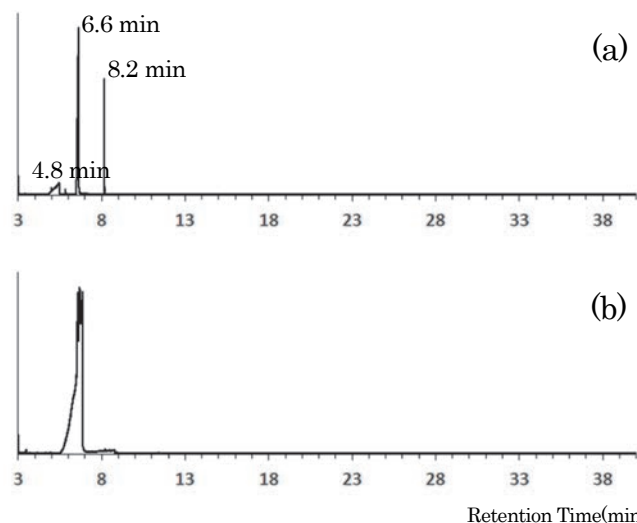


Fig.11 Total ion chromatogram of TMS derivatization of GHB-Na with TMS-PZ and TMCS(condition(G)). (a)upper layer(b)lower layer

4. 要 約

GHB-Na の TMS 化について検討を行い、MSTFA 又は TMCS を用いると、混合するだけで GHB-Na を TMS 化し、容易に GHB-TMS 誘導体を GC-MS で測定できることがわかった。また、これらを用い TMS 化を促進させる際は、超音波による振とうが有効であり、MSTFA を用いた場合は、加熱が更に有効であることがわかった。MSTFA 及び TMCS は、TMCS を 10% 含有する BSTFA 溶液を用いた場合と比較すると、TMS 化剤の混合又は高価な混合済み試薬を使用する必要がなく、特に、TMCS は非常に安価な試薬である。また、MSTFA は、GBL への閉環が起こらないことから、GBL の含有の有無についても判別できることがわかった。

GHB-Na 水溶液について、TMS-PZ Kit 及び TMCS を用いることにより、水溶液の状態でも TMS 化を行えることがわかった。

文 献

- 1) 室井 洋昭, 岡崎 龍介, 唯是 稔, 倉本 智和, 寺内 豊, 松崎 隆一: 関税中央分析所報, **42**, 87 (2002).
- 2) 河合 聰: “ガスクロマトグラフィ入門 薬学・医学・農学への応用”, P.65 (1987), (三共出版).
- 3) 東京化成工業株式会社ホームページ: GC 前処理試薬(<http://www.tcichemicals.com/ja/jp/support-download/brochure/A1104.pdf>)
- 4) 河合 聰: “ガスクロマトグラフィ入門 薬学・医学・農学への応用”, P.70 (1987), (三共出版).