

Vanillin의 新微量檢出法 (第一報)

서울大學校 藥學大學

李 - 相 燮 · 金 容 惠

(4289年12月19日受理)

序 論

Vanillin은 香料로서 넓이 使用하고 있을뿐만아니라 이香味때문에 藥劑로서 U.S.P XVI에 는 生藥Vanilla와 製劑Vanillin Tincture를 收載하고있다. 文獻상에記載된 Vanillin의 檢出法을 살펴볼것같으면

過chlor鐵反應에依한 靑紫色反應¹⁾, ammonia alkali性에서 Natrium hypobromit에依하여 琥珀色反應²⁾, Vanillin을適當量의 苛性曹達에녹히고 過剩의 ammonia alkali 性 Ferricyan加里를加하면 漸次 黃金色反應³⁾, Vanillin 을 phenol과 濃黃酸混合物과 混和後 alkali性으로하고 冷所에放置하면 赤色反應⁴⁾, 濃黃酸과 α -naphthol를加하면靑赤色, p-naphthol로는 綠色反應⁵⁾, Resorcin과 黃酸으로 朱色反應⁶⁾, Resorcin과 鹽酸으로 不安全한 靑紫色反應⁷⁾, Phloroglucin과 黃酸으로赤色反應⁸⁾, Phloroglucin과 鹽酸으로 赤色反應⁹⁾, Vanillin水溶液에黃酸及 Anillin을加하면 黃色反應¹⁰⁾, Thiophen과 黃酸을加하고 alcohol를 注加하면綠色 또는 靑綠色反應¹¹⁾, 黃酸이나 鹽酸存在下 pyrrol를 加하면 櫻桃色反應¹²⁾ Vanillin水溶液 또는醋酸溶液에 Brom를 加하면赤色沈澱¹³⁾ Brom水과 黃酸第一鐵으로 靑色乃至靑紫色反應¹⁴⁾ 20%炭酸曹達溶液에 phosphowolfram酸, phospho molibden酸으로 靑色反應¹⁵⁾, Acenaphten과 濃黃酸으로 靑赤色反應¹⁶⁾, 濃黃酸에 녹힌 OXi dimorphin으로 綠色環反應¹⁷⁾, Millon試藥으로 安全한 赤色反應¹⁸⁾, alkali性에서 m-dinitro benzene과 加溫하면 紫色反應¹⁹⁾, Vanillin 昇華物을 Aceton에 녹히고 蒸發하여 생기는 結晶形을顯微鏡으로 觀察²⁰⁾, 이와같은 檢出法以外에도 許多한方法이 있으나 大部分이 獨特한反應이 아닌 芳香族化合物의 水酸基反應또는 aldehyde反應으로서 確實性이없을뿐만아니라 아주 銳敏한 檢出法이되지 못하고 이중에서 가장銳敏하고 確實한方法을 Folin Denis Reaction²¹⁾ 으로 여기에 使用한 20%炭酸曹達代身, 16%炭酸曹達를使用하면 0.2mg까지 檢出할수있다고한다²²⁾.

이제報告로저하는 方法은 Vanillin Anilin反應에依한 黃呈色反應을 paper chromatography에應用하는方法으로 完全히 確認하는데 10-20r로서 充分히 檢出할수있는 銳敏한方法이다.

또 Vanillin의 定量法을살펴보면 β -naphthylhydrazine 또는 p-bromophenyl hydrazine으로 β -naphthyl hydrazon 또는 p-Brom-phenylhydrazon으로 하여定量²³⁾, m-nitro-benzyl hydrazon으로²⁴⁾ Picrin酸 methyl ether로比色²⁵⁾, N/2 Kali Lauge를 過剩量加하여 Lauge의 殘量을 N/2 HCl로逆滴定²⁶⁾, KHSO₅와結合시키고 殘量을 N/10 I₂로逆滴定²⁷⁾, Vanillin을 hydrazon으로 만들고 남은 hydrazin을 Iodine과 Sodium Thiosulfate로 逆滴定²⁸⁾, 2,4-dinitrophenylhydrazine 으로 hydrazone을 만드는 重量分析²⁹⁾ 分光光度計를使用하여 alkali處理를 한것과않한것을 紫外線部分에서 比較하여 關係式을만들고³⁰⁾, hydroxylamin에 alkali를加하여 生成鹽을 除去한溶液에 Vanillin을加하고 放置後 naphthylred를 指示藥으로하여 鹽酸으로滴定³¹⁾ 한다.

以上과같은 여러가지 定量法도 要約하면 亦是水酸基와 aldehyde反應을 利用한것이고 分光學的으로 檢出한것은 紫外線部位에서 論하고있다.

筆者는 Alcohol中에서 Anilin 과 Vanillin의 黃呈色反應을 spectrophotometer로測定時 435mu에 最大吸光이 나타나며 이點에서는 各濃度의 Sample 가 Lambert Beer의 法則에 適用되는것을 發見

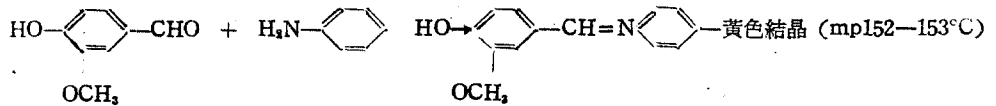
하였으므로 1mg—20mg사이에서 定量할수있으나 正確한 Time Variation을 求明치아니하였다. 故로 이 新檢出法의 實地應用과아울러 正確한 定量法을 第二報에서 論하고져한다.

實驗之部

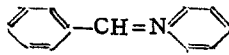
Vanillin Anilin反應

文獻上에記載된바같이 Vanillin을 Alcohol에녹혀 여기에 1當量의 Anilin을加하여 濃縮한後 Desiccator中에 數日間放置함으로써 4-oxy-3-methoxy-benzal Anilin, m.p. 152—153°의 黃色結晶을얻었으며 이것은 alcohol에 易溶性 물에는難溶性 石油Ether에는 不溶性이다.

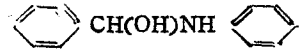
一般的으로 aldehyde 와 Amine은 쉽게反應하나 aliphatic aldehyde 와 Anilin이 作用하면 無色物質이고 aromatic aldehyde와 反應時에는 그構造에따라 差異가생긴다. 例를들면



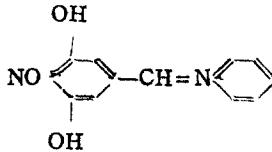
4-oxy-3-methoxy-benzal-Anilin



微黃色 結晶



無色結晶



赤色結晶

여기서 benzal Anilin은 微黃色을 띠하나 그色度는 p-oxy-m-methoxy benzal anilin에 比할바 못된다. 그러나 이 物質이 黃色인것만으로 Vanillin을 確認할수없는것임으로 paper chromatography로 展開하여 Rf를 考慮한다.

Paper Chromatography에 의한 檢出方法

Vanillin 의 alcohol溶液을 Whatman Filter paper No.2 2.5×35cm Strip에 micropipette로 Spot를 찍고 乾燥後 methanol를 飽和시킨 石油benzene (b.p 60°)을 展開劑로 Ascending method로 3時間 室溫에서 展開시킨後 Anilin을 Spray하면 濃黃色 spot가 Rf 0.63에 나타나고 含水 n-Butanol로 展開時에는 Rf 0.90에서 黃色 Spot가 나타난다. Sample量이 50t以上이면 Anilin을 Spray할必要도없이 Anilin이던 容器가까지두면 Anilin의 蒸氣에依하여 自然發色한程度로 paper上에서 銳敏하다 展開시킨後檢出할수있는 最少量은 10t이다 濾紙上에 Spot를찍고 展開시키지않고 發色시킬時는 5t까지 發色이된다.

Anilin Vanillin反應과 phospho Molybden酸 反應의 共用

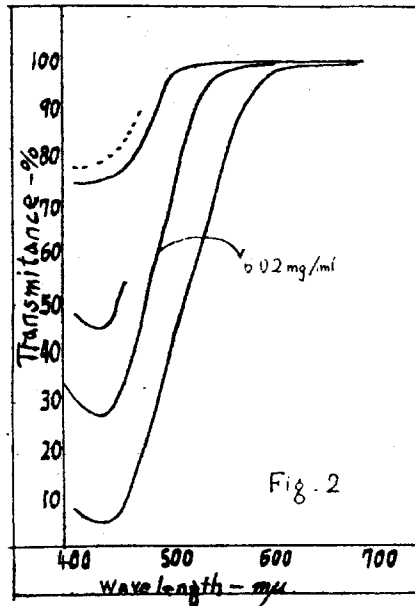
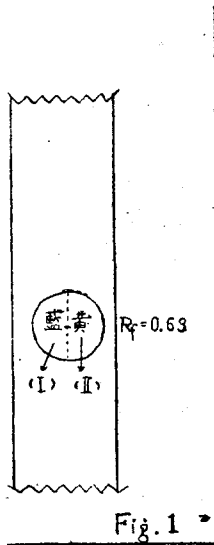
Anilin-Vanillin反應이 Vanillin 와 Aldehyde基反應임으로 Vanillin의 水酸基反應도 同時에檢出하는 聯立方法을만들면 如何한 類似物質이 混入하여있더라도 識別할수있으리라되므로 다음과같은 方法을 案出하였다.

Vanillin 50t에該當하는 Sample를 위方法과 同一操作으로 展開시킨後(例圖¹⁾와같이 ①部를 Cover한後 Anilin을 Spray하고 다시發色한部分 ②를 Cover한後 3% 磷모리브덴 酸水溶液을 Spray한後 다시 3% NaOH水溶液을 Spray하면 Rf 0.63 (Methanol Sat. Benzine) Rf 0.90 (Water

Sat n-Butanol) 에서 黃色部位의 殘部가藍色으로 發色한다 이때磷酸 모리브덴反應은 Anilin反應보다는 銳敏하지못함으로 Sample를 50 l 以上の 該當量이어야한다.

分光光度計에依한定量法

Vanillin을 98% alcohol에 녹이고 여기에當量보다 若干過剩量에 せ로蒸溜한 Anilin을 加하고 이것을 여러가지로 98% alcohol로 倍數稀시킨後 室溫에서 20分間 發色釋시킨後 그 Spectral Transmittance Curve를 測定한바 例圖(2)와같은 結果를얻었다. 使用한分光光度計는 Coleman Junior Type 이며 6-310 (10×75mm) Cuvette를使用함. 最大吸光點은 435mu이며 이點에서 定量用對數直線을 그릴 수있다.



考 察

Vanillin-Anilin反應이 Paper上에서는 極히銳敏하여 黃色으로 發色되는것을 發見하고 이反應을 Vanillin檢出에 利用코져 Paper chromatography에導入하여 10μ以上이면 容易하게檢出할수 있는方法을 案出하고 또이呈色反應이 Lambert-beer의法則에 該當됨으로 定量法이 될수있음을 示唆함

이研究에 많은指導를하여주신 韓龜東 禹麟根 兩教授任과 여러가지便宜를 圖謀하여주신, 中央化學研究所許鈴先生께 謝意를表합니다.

文 獻

- 1) TIEMANN, Koppe : B. 14, 1024 (1881)
- 2) DEHN, Scott : J. Am. chem. 30, 1421 (1907)
- 3) Candussio : Ch Zeitung. 24, 300 (1900)
- 4) Kastle : Chem. Zen. 1906 I, 1575
- 5) Welmans : Chem. Zep 1893 11, 830
- 6) Singer : Monatshefte. 3, 401 (1882)
- 7) Etti : Monatschette. 3, 643 (1882)
- 8) Singer : Monatschette. 3, 401 (1882)
- 9) Lindt : Zeitschrift für Ana.chem. 26, 260 (1884)
- 10) Singer : Monatschette. 3, 400 (1882)
- 11) Ihl : Chem. Zeitung 14, 1707 (1890)
- 12) Thi : Chem. Zeitung 14, 1571 (1890)
- 13) Pisorschi : B 43, 2139 (1911)
- 14) Hubbard : Che. Zen. 1913 I 848
- 15) Eolin Denis : Chem. Zen. 1913 I 848
- 16) De Fazl : Gazetta chimica Italiana 46. I 334 (1916)