

新規保持型液液抽出 Chem Elut S カートリッジによるアゾ染料由来の 芳香族アミン 24 種の前処理



Author

山下 和之

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Chem Elut S は合成充填剤を使用した新しい保持型液液抽出(SLE)用のサンプル前処理製品です。従来から SLE に使用されている珪藻土を充填剤としたカラムと同様に使用することができ、ロット間差の大きい天然物の珪藻土の充填剤よりも高い再現性が期待されます。

「厚生労働省令第 124 号(2015 年 7 月 9 日付)」に示された方法ではアゾ染料に由来する芳香族アミン 24 種類について繊維製品からの抽出工程の後、SLE で処理する工程が規定されています。

本研究では Chem Elut S と弊社で従来から発売している珪藻土カラム Chem Elut および他社の珪藻土カラム 2 種を使用して同令で規定されている方法の中から SLE 処理の部分について試験を行ない、Chem Elut S が回収率、再現性に優れていることを確認しました。

Key words: アゾ染料、芳香族アミン、珪藻土カラム、Chem Elut S、VF-35ms、GC/MS

はじめに

「厚生労働省令第 124 号 (2015 年 7 月 9 日付)」にアゾ化合物を含有する染料が使用されている繊維製品について 24 種類のアゾ化合物(芳香族アミン)を分析する方法が規定されており、繊維製品から抽出した試料を SLE カラムで処理する工程が含まれています。

Chem Elut S の充填剤は新規に開発された SLE 用の合成充填剤で、従来の SLE 用担体である珪藻土の問題点を解決したものです。天然物である珪藻土は形状が不規則でばらつきが大きく、細粒があるため、バッチ間での通液性に差があり、再現性にも問題がありました。Chem Elut S の充填剤は合成品であるため、形状が安定しており、粒度分布も狭く、通液性が安定しており、バッチ間での再現性も良好です。

本アプリケーションノートでは上記「省令」内に規定されている方法に基づき、Chem Elut S、弊社の従来品で珪藻土を使用している Chem Elut、および他社の珪藻土カラムを使用して SLE 処理を行ない、GC/MS により分析し、分析対象とされている 24 種のアゾ化合物について、回収率、再現性の確認試験を行なったので報告します。

実験方法

(1) 材料

試薬は以下のものを使用しました。

特定芳香族アミン類混合標準液(24 種) 10 µg/mL:

関東化学製 (49862-71)

メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE): 東京化成製 (B0991)

クエン酸水素二ナトリウム: 関東化学製 (37218-01)

5mol/L 水酸化ナトリウム水溶液: 関東化学製 (37944-08)

純水: ミリポア製ミリ Q で製造しました。

SLE カラムは以下のものを使用しました。

アジレント Chem Elut S 20mL (P/N5610-2011)

アジレント Chem Elut 20mL (P/N 12198008)

他社製珪藻土カラム 20mL 用 2 種 (他社品 A、B)

GC/MS の構成は以下の通りです。

GC: アジレント 7890B

GC/MS: アジレント 5977B MSD

カラム: アジレント VF-35ms 30m, 0.25mmid, 0.25µm
(P/N CP5889)

(2) 試料前処理

0.06mol/L のクエン酸水素二ナトリウム液に 5 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を滴下して pH 6.0 に調整したものをクエン酸緩衝液としました。

特定芳香族アミン類混合標準液 500µL をクエン酸緩衝液で 500mL にメスアップしたものを試料液としました。

試料液 20mL を各 SLE カラムに負荷し、15 分静置後、MTBE を 80mL 流して溶出し、溶出液をエバポレータで 2mL まで濃縮し、GC/MS 注入用試料としました。

注入用試料には計算上 24 種の芳香族アミンが 100ng/mL の濃度で含まれていることとなります。

(3) 分析条件

GC 条件を表 1 に、MS 条件を表 2 に、芳香族アミン類の MS 条件と ISO¹⁾で規定された回収率のスペックを表 3 に示します。厚生労働省令も ISO に準じた方法になっており、各芳香族アミンの処理工程における回収率も同じレベルにすることが必要です。ただし ISO では分析対象が 22 物質、日本の厚生労働省令では 24 種が規定されているので、ISO のスペックの規定がないものが 2 物質あります。この回収率は SLE の部分だけではなく、分析法全体を通しての回収率になります。

表1 GC 条件

カラム	VF-35ms 30m, 0.25mmid, 0.25 μ m (P/N CP5889)
注入法	1 μ L, スプリット 15:1
ライナ	スプリットライナ、ウルトラライナート、 シングルテーパ (P/N 5190-2295)
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
カラム流量	1mL/min コンスタントフロー
オープン 温度	55 $^{\circ}$ C(5min)-15 $^{\circ}$ C/min-230 $^{\circ}$ C(0min)-5 $^{\circ}$ C /min-290 $^{\circ}$ C(0min)-20 $^{\circ}$ C/min-310 $^{\circ}$ C(5min)

表2 MS 条件

トランスファー ライン	290 $^{\circ}$ C
イオン源温度	280 $^{\circ}$ C
四重極温度	150 $^{\circ}$ C
取り込み	Scan m/z =60~300 および SIM(表 3 参照)
チューニング	etune
エクストラクタ レンズ径	6mm

表3 芳香族アミン類の MS 条件と回収率のスペック

	CAS No.	定量イオン	回収率のスペック
o-Toluidine	95-53-4	106	>50
2,4-Xyldine	95-68-1	121	なし
2,6-Xyldine	87-62-7	121	なし
o-Anisidine	90-04-0	123	>70
4-Chloroaniline	106-47-8	127	>70
p-Cresidine	120-71-8	137	>70
2,4,5-Trimethylaniline	137-17-7	120	>70
4-Chloro-o-toluidine	95-69-2	141	>70
2,4-Diaminotoluene	95-80-7	122	>50
2,4-Diaminoanisoole	615-05-4	138	>20
2-Naphtylamine	91-59-8	115	>70
5-Ntro-o-toluidine	99-55-8	152	>50
4-Aminobiphenyl	92-67-1	169	>70
4-Aminoazobenzen	60-09-3	197	>70
4,4'-Oxydianiline	101-80-4	200	>70
4,4'-Methylenedianiline	101-77-9	197	>70
Benzidine	92-87-5	184	>70
o-Aminoazotoluene	97-56-3	106	>50
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	838-88-0	226	>70
3,3'-Dimethylbenzidine	119-93-7	212	>70
4,4'-Thiodozianiline	139-65-1	216	>70
3,3'-Dichlorobenzidine	91-94-1	252	>70
4,4'-Methylene-bis-2-chloro-aniline	101-14-4	266	>70
3,3'-Dimethoxybenzidine	119-93-7	244	>70

結果および考察

(1)GC/MS 分析の再現性と検量線

図 1 に標準物質の MS クロマトグラムを示します。

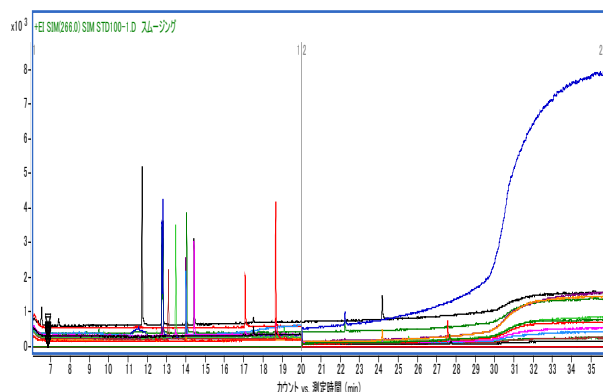


図 1 芳香族アミン類の MS クロマトグラム 濃度 100ng/mL

良好な分離とピーク形状が確認されました。

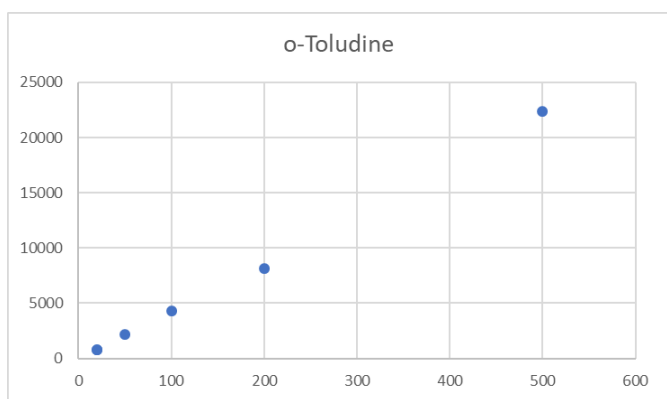
表 4 に濃度 100ng/mL の標準物質でのピーク面積値の CV 値を示します。

表 4 芳香族アミン類の 100ng/mL 濃度での面積値の CV 値(%) n=4

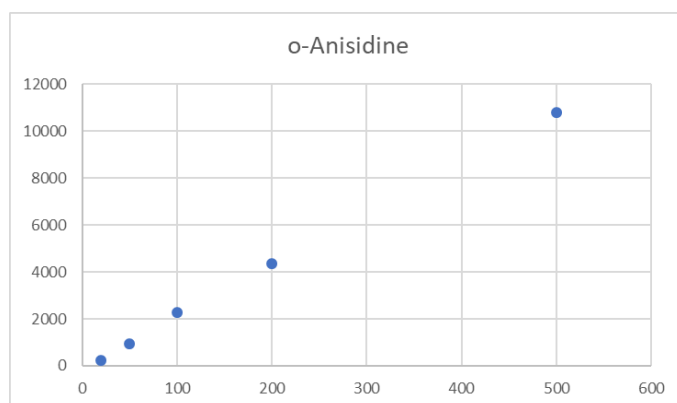
物質名	CV 値
Toluidine	6.8
2,4-Xylidine	10.1
2,6-Xylidine	5.1
o-Anisidine	5.3
4-Chloroaniline	5.2
p-Cresidine	6.8
2,4,5-Trimethylaniline	5.3
4-Chloro-o-toluidine	2.9
2,4-Diaminotoluene	6.9
2,4-Diaminoanisoie	6.1
2-Naphtylamine	10.1
5-Ntro-o-toluidine	5.2
4-Aminobiphenyl	10.0
4-Aminoazobenzen	11.2
4,4'-Oxydianiline	8.9
4,4'-Methylenedianiline	19.7
Benzidine	13.7
o-Aminoazotoluene	9.3
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	9.7
3,3'-Dimethylbenzidine	11.2
4,4'-Thiodozianiline	10.0
3,3'-Dichlorobenzidine	4.5
4,4'-Methylene-bis-2-chloro-aniline	5.4
3,3'-Dimethoxybenzidine	13.2

全般的に良好な再現性が得られました。

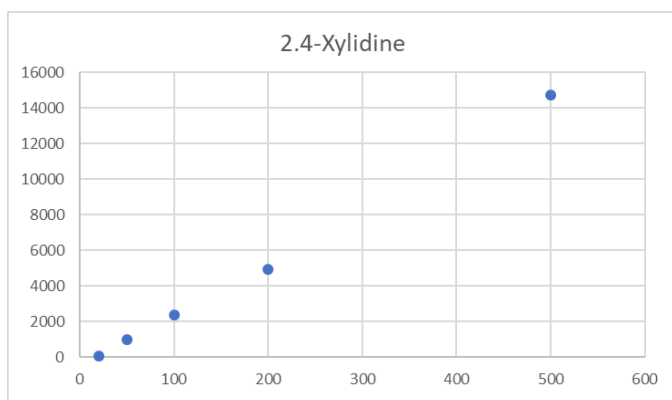
図 2 に各芳香族アミンの検量線と相関係数、定量下限を示します。定量下限は 10、20、50、100、200、500ng/mL の 6 段階の標準品溶液を作成し、S/N 比 10 以上かつ検量線が直線になる最低濃度を定量下限としました。横軸に濃度(ng/mL)、縦軸にピーク面積値をプロットしました。



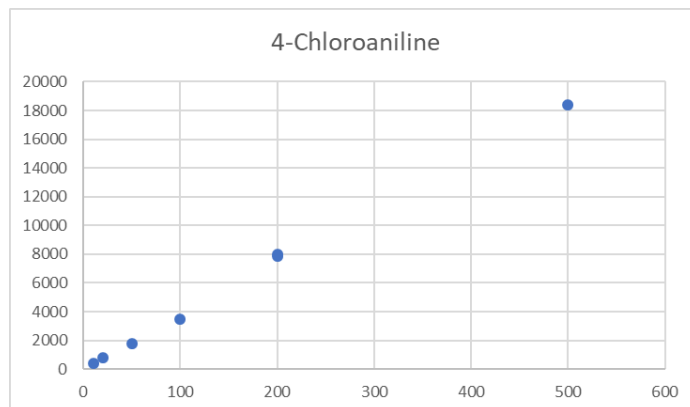
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9994$



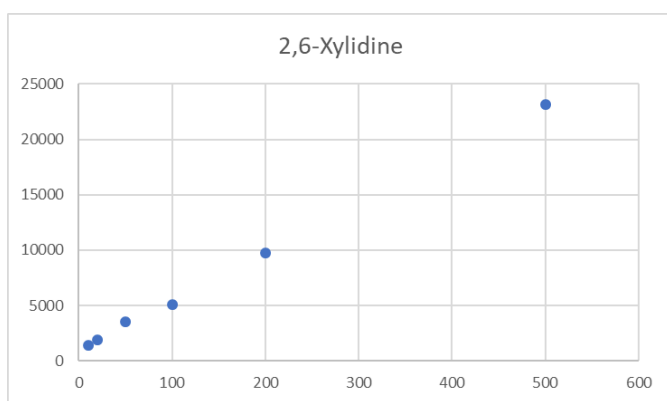
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9997$



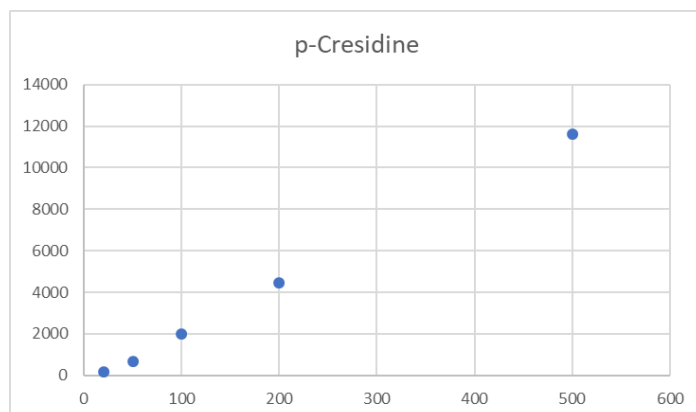
定量下限: 10ng/mL $r^2=0.9989$



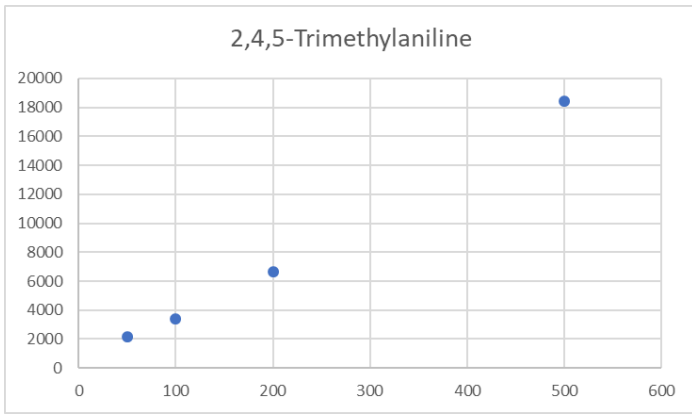
定量下限: 10ng/mL $r^2=0.9988$



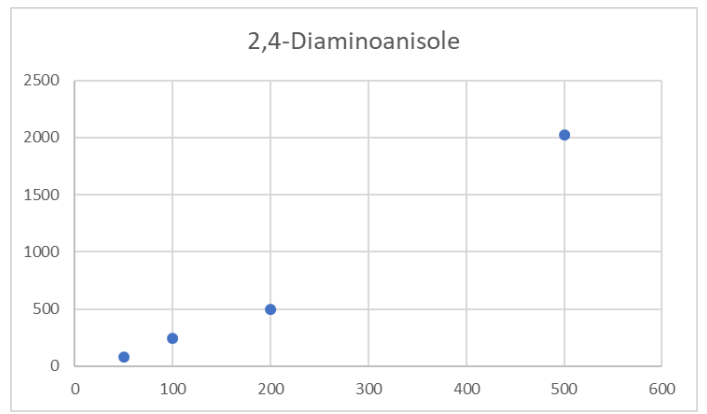
定量下限: 10ng/mL $r^2=0.9989$



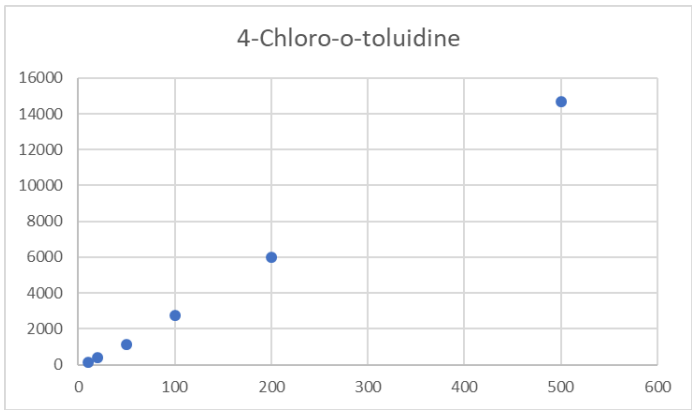
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9998$



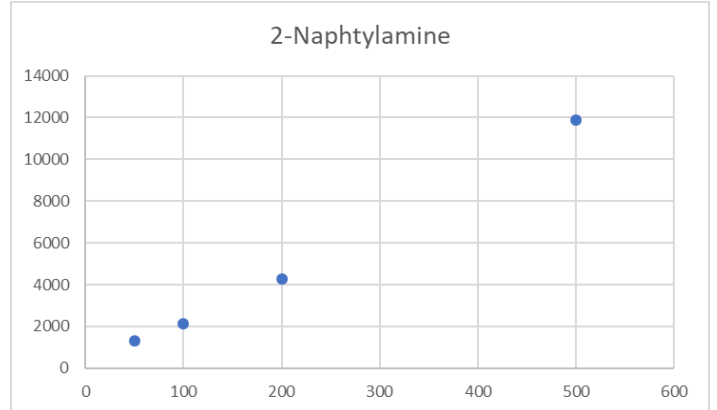
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9982$



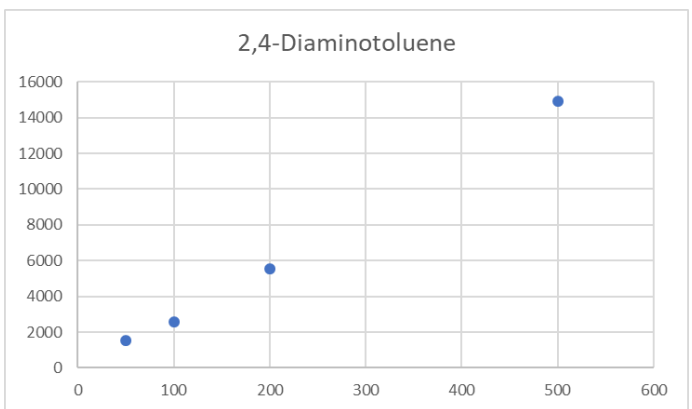
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9925$



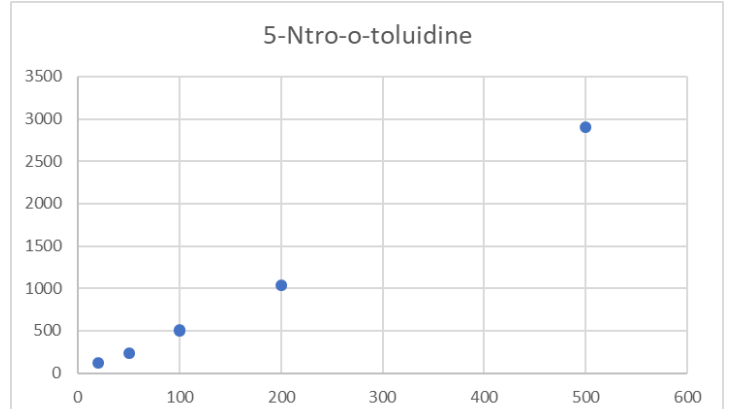
定量下限: 10ng/mL $r^2=0.9997$



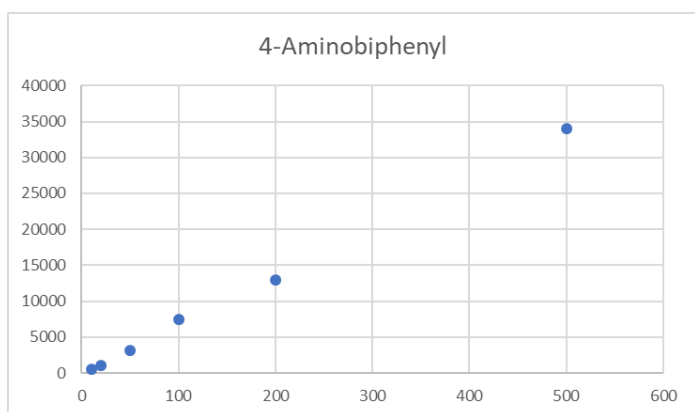
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9986$



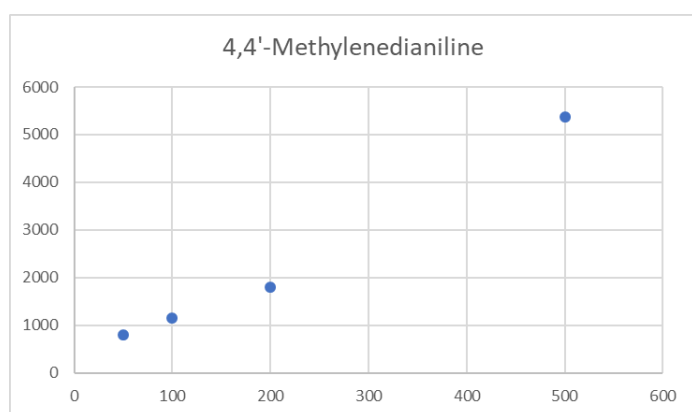
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9993$



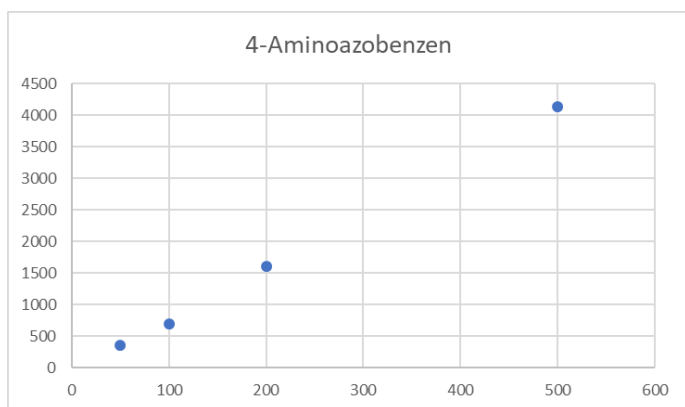
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9989$



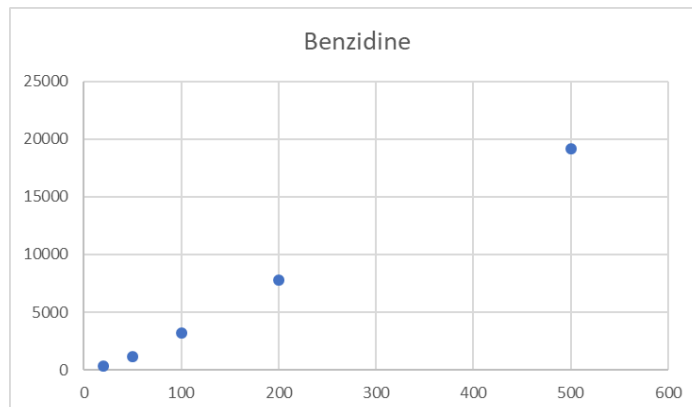
定量下限: 10ng/mL $r^2=0.9993$



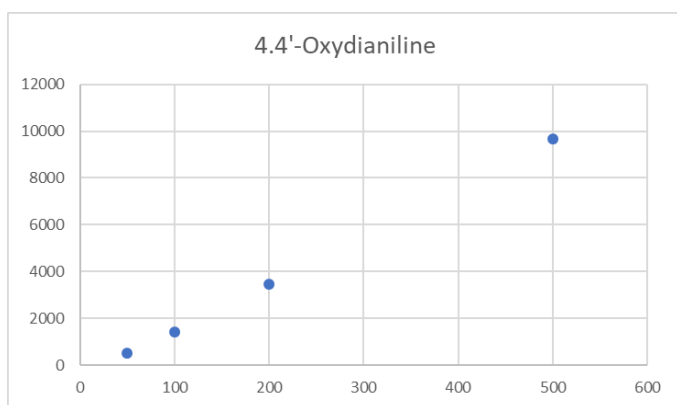
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9933$



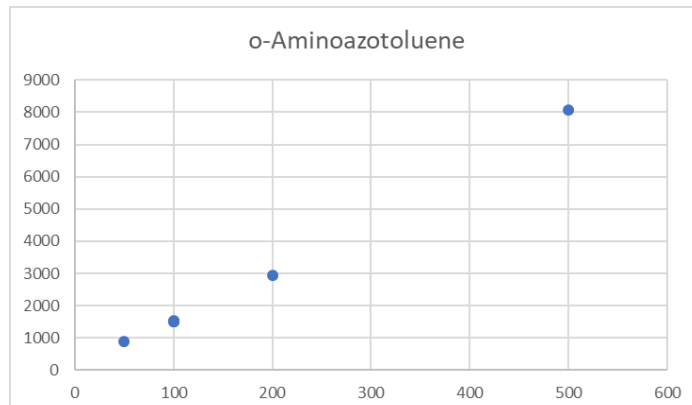
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9997$



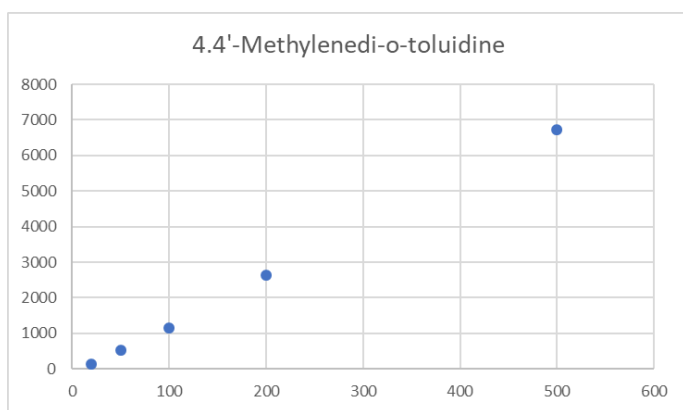
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9994$



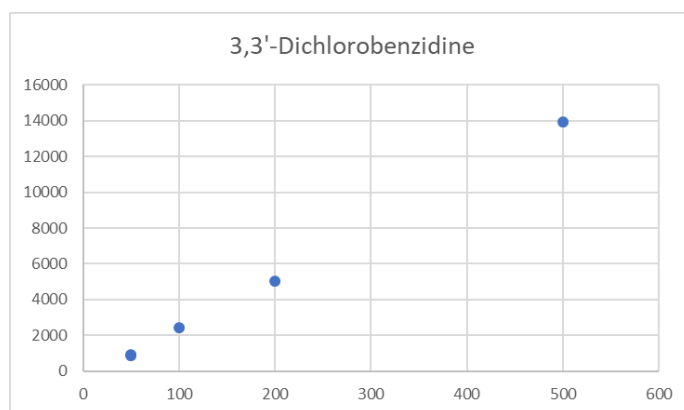
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9998$



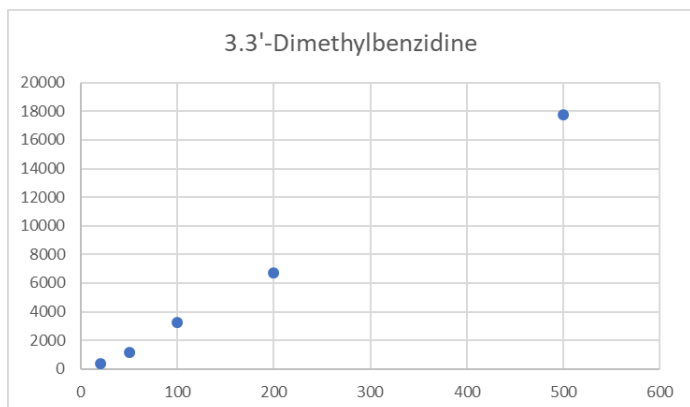
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9990$



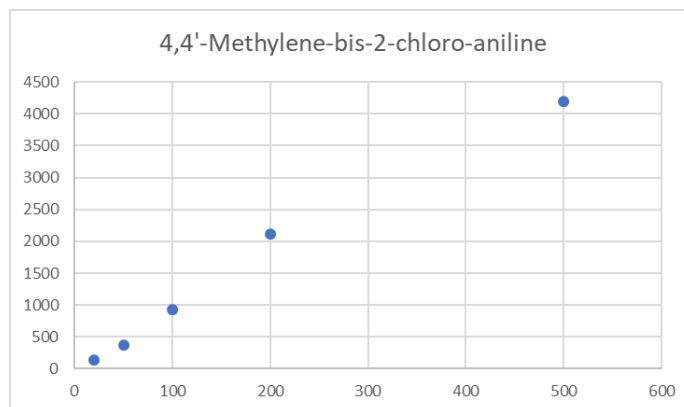
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9998$



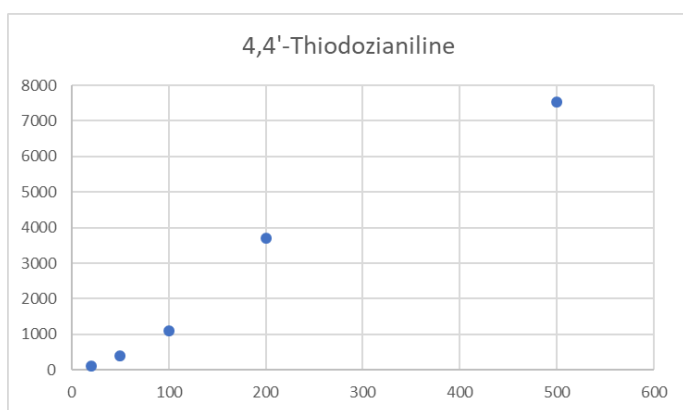
定量下限: 50ng/mL $r^2=0.9997$



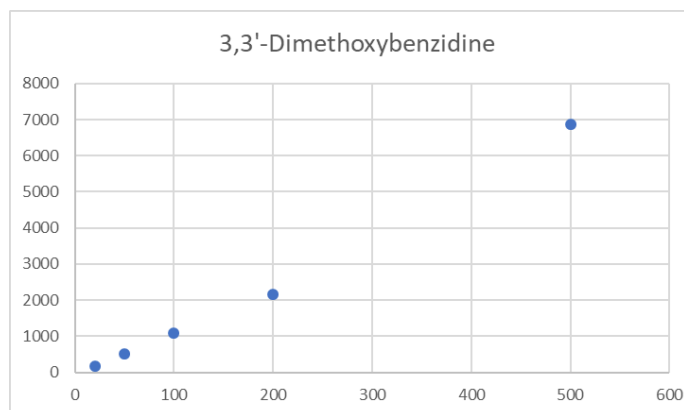
定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9997$



定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9925$



定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9907$



定量下限: 20ng/mL $r^2=0.9967$

図2 芳香族アミン類の検量線

定量下限値は物質により 10~50ng/mL と差がありますが、定量下限値から 500ng/mL の濃度範囲では概ね良好な直線性が得られました。

(2)前処理での回収率と再現性

図 3 に Chem Elut S で処理した試料の MS クロマトグラムを示します。

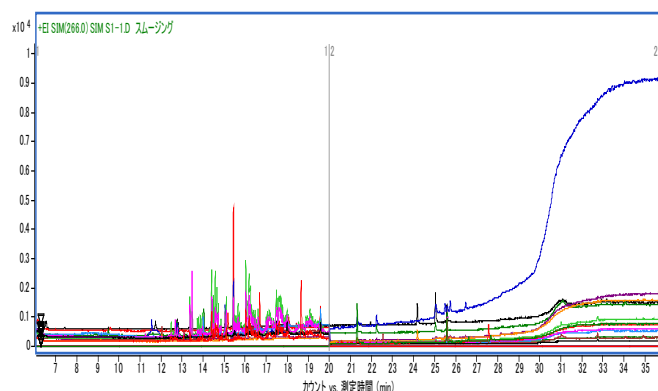


図 3 Chem Elut S で処理した試料の MS クロマトグラム

図 1 と比較して若干の夾雑ピークが見られますが、定量に問題はありませんでした。

表 5~8 に各 SLE カラムで処理した際の各芳香族アミン類の回収率と n=4 での CV 値を示します。

100ng/mL 濃度での面積値の CV 値を示します。

表5 Chem Elut S で処理した際の芳香族アミン類の回収率と再現性 n=4

物質名	回収率%	CV 値%
Toluidine	91.4	10.2
2,4-Xylidine	75.6	3.8
2,6-Xylidine	90.4	9.0
o-Anisidine	88.7	11.6
4-Chloroaniline	89.4	8.8
p-Cresidine	95.7	8.1
2,4,5-Trimethylaniline	91.6	11.2
4-Chloro-o-toluidine	88.4	12.6
2,4-Diaminotoluene	85.0	7.4
2,4-Diaminoanisole	85.4	22.1
2-Naphtylamine	91.3	7.1
5-Ntro-o-toluidine	83.2	15.2
4-Aminobiphenyl	84.7	8.8
4-Aminoazobenzen	95.0	7.3
4,4'-Oxydianiline	76.8	8.9
4,4'-Methylenedianiline	83.0	8.6
Benzidine	105.8	4.9
o-Aminoazotoluene	89.0	7.5
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	80.0	6.4
3,3'-Dimethylbenzidine	75.0	4.8
4,4'-Thiodozianiline	81.1	3.2
3,3'-Dichlorobenzidine	96.2	7.8
4,4'-Methylene-bis-2-chloro-aniline	85.3	5.4
3,3'-Dimethoxybenzidine	80.5	14.8

表6 Chem Elutで処理した際の芳香族アミン類の回収率と再現性 n=4

物質名	回収率%	CV 値%
Toludine	84.1	15.7
2,4-Xylidine	88.0	19.5
2,6-Xylidine	67.6	32.9
o-Anisidine	101.7	27.6
4-Chloroaniline	104.5	15.5
p-Cresidine	111.3	14.6
2,4,5-Trimethylaniline	159.2	13.4
4-Chloro-o-toluidine	91.6	38.1
2,4-Diaminotoluene	101.3	15.1
2,4-Diaminoanisole	78.6	21.8
2-Naphtylamine	96.4	17.9
5-Ntro-o-toluidine	107.1	16.3
4-Aminobiphenyl	83.6	14.4
4-Aminoazobenzen	124.6	12.6
4,4'-Oxydianiline	50.1	19.1
4,4'-Methylenedianiline	83.9	31.3
Benzidine	55.1	15.2
o-Aminoazotoluene	112.9	6.9
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	70.2	12.6
3,3'-Dimethylbenzidine	118.6	15.7
4,4'-Thiozodianiline	97.8	14.3
3,3'-Dichlorobenzidine	141.9	9.2
4,4'-Methylene-bis-2-chloro-aniline	119.5	11.3
3,3'-Dimethoxybenzidine	105.5	22.5

表7 他社品Aで処理した際の芳香族アミン類の回収率と再現性 n=4

物質名	回収率%	CV 値%
Toludine	88.7	32.4
2,4-Xylidine	82.1	23.9
2,6-Xylidine	119.9	32.6
o-Anisidine	97.3	18.4
4-Chloroaniline	93.5	20.4
p-Cresidine	105.8	25.0
2,4,5-Trimethylaniline	74.1	22.1
4-Chloro-o-toluidine	72.9	24.5
2,4-Diaminotoluene	77.6	23.5
2,4-Diaminoanisole	167.1	28.1
2-Naphtylamine	78.0	8.0
5-Ntro-o-toluidine	104.9	10.5
4-Aminobiphenyl	95.0	13.1
4-Aminoazobenzen	124.6	7.9
4,4'-Oxydianiline	56.9	7.9
4,4'-Methylenedianiline	103.5	25.6
Benzidine	54.6	10.3
o-Aminoazotoluene	76.5	10.4
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	71.2	9.2
3,3'-Dimethylbenzidine	52.4	5.9
4,4'-Thiozodianiline	58.7	4.3
3,3'-Dichlorobenzidine	118.1	10.2
4,4'-Methylene-bis-2-chloro-aniline	81.3	10.4
3,3'-Dimethoxybenzidine	70.3	5.8

表8 他社品Bで処理した際の芳香族アミン類の回収率と再現性 n=4

物質名	回収率%	CV 値%
Toludine	49.0	18.4
2,4-Xylidine	125.8	15.5
2,6-Xylidine	91.7	18.1
o-Anisidine	79.1	18.5
4-Chloroaniline	104.7	20.4
p-Cresidine	113.0	21.4
2,4,5-Trimethylaniline	135.0	16.5
4-Chloro-o-toluidine	93.8	30.4
2,4-Diaminotoluene	108.3	23.5
2,4-Diaminoanisole	118.4	29.1
2-Naphtylamine	71.0	8.0
5-Ntro-o-toluidine	114.9	10.8
4-Aminobiphenyl	61.8	12.4
4-Aminoazobenzen	129.6	7.9
4,4'-Oxydianiline	41.2	8.9
4,4'-Methylenedianiline	145.3	17.3
Benzidine	55.0	10.3
o-Aminoazotoluene	122.3	14.6
4,4'-Methylenedi-o-toluidine	120.6	12.6
3,3'-Dimethylbenzidine	82.4	3.0
4,4'-Thiodozianiline	58.7	4.4
3,3'-Dichlorobenzidine	100.2	12.1
4,4'-Methylene-bis-2-chloro-aniline	79.5	7.5
3,3'-Dimethoxybenzidine	63.9	17.6

表5の結果を表3の回収率のスペックと対照してみると、Chem Elut SによるSLE処理では、このスペックを十分に満たしていると言えます。「厚生労働省令第124号」もISOに準じた基準になっているので、本省令の基準も満たしていると言えます。このスペックは布等の試料からの抽

出などの他の工程も含めた分析法全体に求められるスペックであり、今回試験を行ったSLEはその工程の一部で、他の工程での低減の可能性を考慮すると、スペックを十分に満たしていることが必要です。その点からも十分な回収率が得られたと言えます。また再現性も概ね良好であり、新規合成SLE単体のChem Elut Sが本試験法に適していることが確認されました。

一方、表6~8のアジレントの従来品のChem Elutや他社品A、Bは天然物の珪藻土を原料としており、一部の芳香族アミンが低回収率になるものが見られ、一方でマトリクス効果により120%を超える高い回収率になったケースもあり、再現性もChem Elut Sに比べると劣る結果となりました。

以上の結果から、新規合成SLE単体のChem Elut Sは従来型の珪藻土を充填剤としたSLEカラムよりも高性能で「厚生労働省令第124号」のアゾ色素由来の芳香族アミン分析の工程にある、SLEによる処理に適した製品であると言えます。

まとめ

新規合成SLE担体のChem Elut Sで「厚生労働省令第124号」に規定されたアゾ色素由来の芳香族アミン分析の工程にある、SLEによる処理を行ない、GC/MSで回収率を確認した結果、従来型の珪藻土を充填したSLEカラムに比べて回収率、再現性とも良好で、本省令による分析法に適したSLEカラムであることが確認されました。

参考文献

- INTERNATIONAL STANDARD ISO 14362-1 First edition 2017-02

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, December 26, 2018

GC-MS-202001YS-001

DE44306.9622569444