

# Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl およびStableBond Phenylカラムの独特な 選択性を用いた、有害アゾ色素アミンの 分離

## アプリケーション

## コンシューマープロダクツ

### 著者

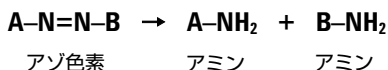
John W. Henderson Jr. and William J. Long  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610  
USA

### 概要

MSに対応する移動相グラジエントを備えたAgilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylカラムを用いて、アゾ色素から生じる可能性のある9種類の芳香族アミンを分離しました。その後、2次LC定量手法として、使用カラムをAgilent ZORBAX Stable-Bond Phenylカラムに代えて選択性を大きく変化させました。2つのフェニル相は異なる化学特性を持ちます。そのため、この2つのカラムは、フェニル基を含むアミンの分離に適した組み合わせと言えます。

### はじめに

日常的に使用されている着色された消費者製品の多くは、アゾ色素(染料や顔料)を含んでいます。アゾ色素は、織物、革製品、インク、プラスチックなどに広く用いられ、化粧品や食料品にもしばしば使用されます。一部のアゾ色素は、分解により、発癌性がある(または疑われる)アミンを生成します。一般的なアゾ分解反応は、以下の通りです。



消費者製品は肌や口に接触する可能性があるため、毒性のあるアミンに分解されるおそれのあるアゾ色素は、多くの国で消費

者製品への使用が禁じられています。表1には、ある種のアゾ色素から生じる可能性のある毒性芳香族アミンを示しています。太字で記載されているものが、本研究で分析したアミンです。

表1. EU指令2002/61/EC [1]で消費者製品への使用が禁止されている芳香族アミン

物質名	CAS番号
ベンジジン	92-87-5
ビフェニル-4-アミン	92-67-1 2
2-ナフチルアミン	91-59-8
4-クロロ-o-トルイジン	95-69-2
2,2'-ジクロロ-4,4'-メチレンジアニリン	101-14-4
4-クロロアニリン	106-47-8
3,3'-ジクロロベンジジン	91-94-1
3,3'-ジメトキシベンジジン	119-90-4
3,3'-ジメチルベンジジン	119-93-7
4,4'-メチレンジアニリン	101-77-9
4,4'-メチレンジ-o-トルイジン	838-88-0
4-メチル-m-フェニレンジアミン	95-80-7
2-メトキシアニリン	90-04-0
4-メトキシ-m-フェニレンジアミン	615-05-4
6-メトキシ-m-トルイジン	120-71-8
4,4'-オキシジアニリン	101-80-4
4,4'-チオジアニリン	139-65-1
4-o-トリルアゾ-o-トルイジン	97-56-3
<b>o-トルイジン</b>	<b>95-53-4</b>
5-ニトロ-o-トルイジン	99-55-8
2,4,5-トリメチルアニリン	137-17-7

フェニルタイプの固定相をメタノール移動相と組み合わせれば、C8やC18といった脂肪族固定相とは大きく異なる芳香族アミンの選択性が得られます[2]。フェニル相はフェニル構造を含む物質の分析に使用できるため、芳香族アミンのメソッド開発には最適です。本研究では、特定のアゾ色素の分解で生じる可能性のある、アニリンおよび8種類の毒性アミンを含



む9つのアミンを分離しました。各アミンの構造と、実験手法のセクションに記載した条件下におけるZORBAX Eclipse Phenyl-Hexylカラムでの溶出順序を図1に示しています。

## 実験手法

Agilent 1200 Rapid Resolution LC(RRLC)システムを用いて、HPLC分析を行ないました。

- G1312BバイナリポンプSL、移動相A: 10 mM酢酸アンモニウムを含む水、pH 4.7、酢酸を含む；移動相B: メタノール。流速1 mL/min。グラジエント: 開始時組成25%B、9分で90%B。
- G1376C自動液体サンプラ(ALS) SL。注入量2.0  $\mu$ L。
- G1316B温度制御カラム恒温槽SL。温度25  $^{\circ}$ C。
- G1315Cダイオードアレイ検出器(DAD)。波長220、4 nm Ref=オフ、G1315-60024マイクロフローセル(パス3 mm、容量2  $\mu$ L)を使用。

ZORBAXカラム:

- ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 4.6 mm  $\times$  100 mm、5  $\mu$ m
- ZORBAX StableBond Phenyl 4.6 mm  $\times$  100 mm、5  $\mu$ m

バイアル: アンバースクリューキャップ  
(アジレント部品番号5182-0716)

バイアルキャップ: 青色スクリューキャップ  
(アジレント部品番号5282-0723)

バイアルインサート: 100  $\mu$ Lガラス/ポリマーフィート  
(アジレント部品番号5181-1270)

各芳香族アミンはSigma-Aldrichから入手し、MeOHに溶解して濃度を1 mg/mLとしました。その後、各アミン溶液100- $\mu$ Lを混合して混合サンプルを作成し、水で1:10に希釈しました。

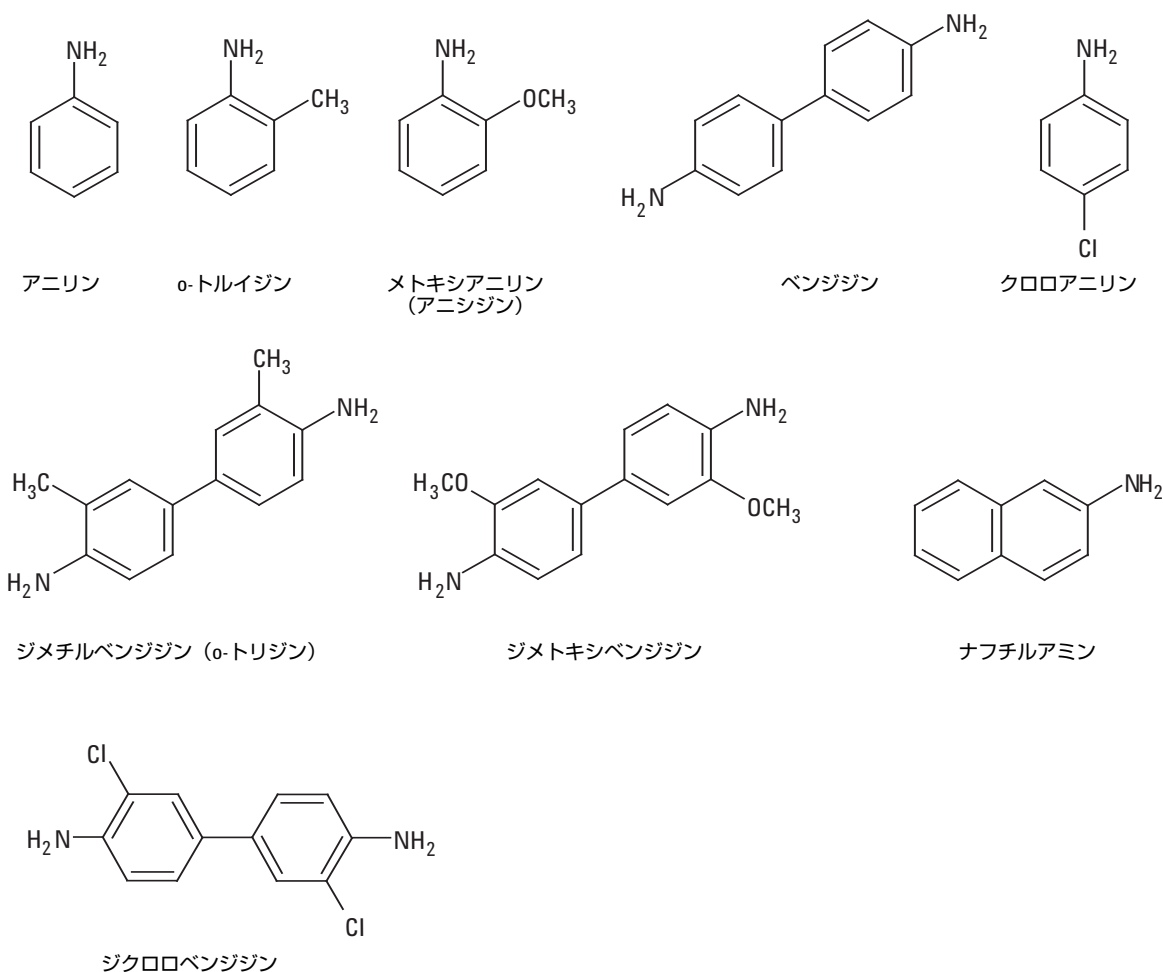


図1. 芳香族アミンの構造

## 結果と考察

サンプルに含まれる様々な芳香族アミンを、適度な時間で分離できる移動相グラジエントが求められます。本研究では、分析物のフェニル基とフェニル固定相との $\pi$ - $\pi$ 作用を利用するために、移動相の有機成分としてメタノールを選択しました。 $\pi$ - $\pi$ 作用は、アセトニトリルよりもメタノールで大きくなります[2, 3]。pH 4.7に調整した酢酸アンモニウムを使用しました。これにより、アミンの保持力が0.1%ギ酸 (pH 2) 移動相に比べて高くなります。アミンの逆相分析では、一般にpH 2よりも大きいpHを使用します。これは、低pHで存在するアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) の水溶性が高く、保持力が低くなるためです。pH 5では、プロトン化した $\text{NH}_3$ が存在し、固定相との相互作用が高くなります。分析物のpKaに近い移動相の使用により生じるピーク形状の悪化は、それほど目立ちません。これはおそらく、グラジエントにより分析物のバンドが集束するためと考えられます。バッファについても、MS検出器に適した揮発性のものを使用します。

ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-HexylカラムとZORBAX StableBond Phenylカラムで分離したアゾ色素アミンのクロマトグラムを図2に示しています。カラム (固定相) が異なる以外は、同一のメソッドを使用しています。

2つのクロマトグラムを比較すると、すべての分析物で保持 ( $k'$ ) 係数が異なり、したがって選択性 ( $\alpha$ ) 係数と分離能が異なっていることがわかります。ベンジジン、クロロアニリン、ジメトキシベンジジン、ナフチルアミンといった一部の分析物については、溶出順序も異なっています。多くの規制メソッドでは、同定を確認するために、通常は2種類のクロマトグラフィ手法が求められます。そのため、選択性の異なるZORBAX Eclipse Plus Phenyl-HexylとZORBAX StableBond Phenylは、使用が禁止されているアゾ色素アミンの分析に最適な組み合わせと言えます。移動相や他のメソッドパラメータが共通しているため、カラム切り替えバルブオプションをカラム恒温槽に設置したAgilent 1200LCを使えば、1つの自動手順で両方のメソッドを連続して実行することが可能です。

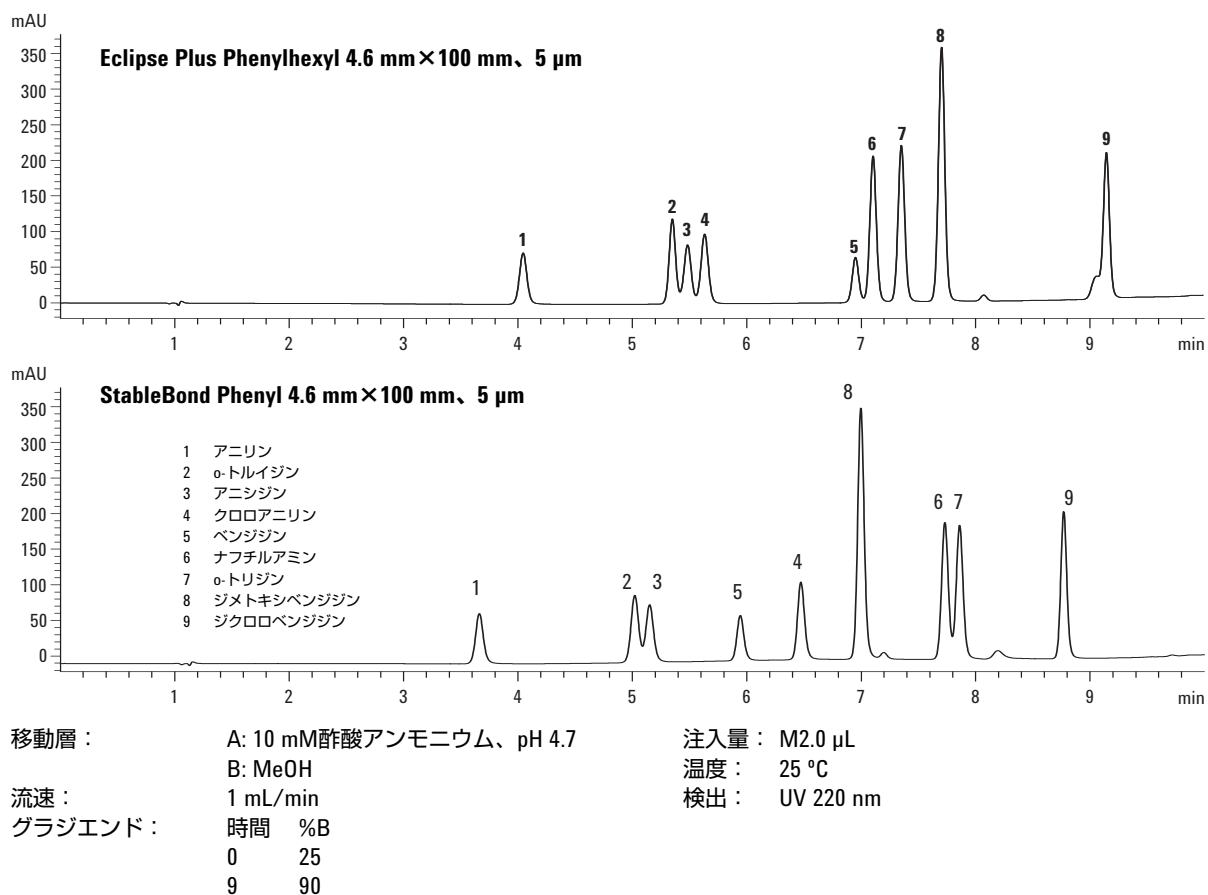


図2. 2種類のAgilent ZORBAXフェニルカラムにおける芳香族アミンの異なる選択性

表2. 2種類のAgilent ZORBAXフェニルカラムの化学的な違い

	Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl	Agilent ZORBAX StableBond Phenyl
エンドキャップ	あり	なし、ただしシラン結合に立体ジイソブチル基
フェニル結合	ヘキシル	プロピル
炭素量%	9%	6%
シリカ基材	改良型タイプB (ZORBAX)	タイプB (ZORBAX)

表2にまとめているように、2つのフェニル相の選択性の違いは、(1)炭素含有量、(2)エンドキャップという2つの要因で説明できます。ヘキシル結合とプロピル結合も、2つの相の選択性の違いに寄与しているものと考えられます。SB相のエンドキャップなしという特性と立体的に大きなジイソプロピル基も、フェニルヘキシルシランの小さなジメチル基や密度の高いエンドキャップシリカとは異なる選択性を生んでいると考えられます。こうした効果により、大きく異なる2つのカラムが生まれています。

## 結論

ZORBAX Eclipse Phenyl-HexylとZORBAX StableBond Phenylカラムは、芳香族アミンなどのフェニルタイプの構造を持つ分析物の分離に最適です。ヘキシル結合や完全なシラノエンドキャッププロセスなど、特別に設計されたカラム特性を持つZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylは、ZORBAX StableBond-Phenylとは選択性の異なるカラムになっています。こうした独特な固定相とメタノール移動相の選択性との組み合わせにより、分析物のフェニル基と固定相の化学作用が高まります。

## 参考文献

1. Opinion on: Report (Final Draft) on “Assessment of the risks to human health posed by azo colorants in toys, writing inks and paper products, and analysis of the advantages and drawbacks of restrictions on their marketing and use.” Opinion expressed at the 24th CSTEEN plenary meeting, Brussels, 12 June 2001 ([http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/sct/docshtml/sct\\_out109\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sct/docshtml/sct_out109_en.htm))
2. M. Yang, et al, “Impact of Methanol and Aceto-nitrile on Separations Based on  $\pi$ - $\pi$  Interactions with Reversed Pphase Phenyl Column,” *J. of Chromatography*, 1097, 124–129, 2005
3. W. Long and J. Henderson, “Unique Selectivity and High Throughput Applications of SB-Phenyl RRHT,” Agilent Technologies publication 5989-6067EN, 2007

## 付録

### 発売中のAgilent ZORBAX Phenyl-Hexylカラム

959990-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、4.6 mm×250 mm
959993-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、4.6 mm×150 mm
959963-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、4.6 mm×150 mm
959996-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、4.6×100 mm
959961-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、4.6 mm×100 mm
959964-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、4.6 mm×100 mm
959933-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、4.6 mm×75 mm
959946-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、4.6 mm×50 mm
959943-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、4.6 mm×50 mm
959941-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、4.6 mm×50 mm
959936-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、4.6 mm×30 mm
959931-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、4.6 mm×30 mm
959993-312	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、3.0×150 mm
959963-312	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、3.0 mm×150 mm
959961-312	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、3.0 mm×100 mm
959964-312	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、3.0 mm×100 mm
959941-312	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、3.0 mm×50 mm
959701-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、2.1 mm×150 mm
959763-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、2.1 mm×150 mm
959793-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、2.1 mm×100 mm
959764-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、2.1 mm×100 mm
959746-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、5 µm、2.1 mm×50 mm
959743-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、2.1 mm×50 mm
959741-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、2.1 mm×50 mm
959733-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、3.5 µm、2.1 mm×30 mm
959731-912	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、1.8 µm、2.1 mm×30 mm
820950-938	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylガード、5 µm、4.6 mm×12.5 mm (4個組)
821125-938	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylガード、5 µm、2.1 mm×12.5 mm (4個組)

発売中のAgilent ZORBAX Phenyl-Hexylカラム

877250-112	ZORBAX PrepHT SB-Phenyl、21.2 mm×50 mm、7 μmカートリッジ
861954-312	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm、3.0 mm×100 mm
863954-312	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm、3.0 mm×150 mm
835975-912	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm、4.6 mm×50 mm
866953-912	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm、4.6 mm×75 mm
863953-912	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm、4.6 mm×150 mm
860975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、2.1 mm×50 mm
883700-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、2.1 mm×150 mm
883975-312	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、3.0 mm×150 mm
880975-312	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、3.0 mm×250 mm
820975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、4.0 mm×80 mm (ZGC)
883975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、4.6 mm×150 mm
880975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、4.6 mm×250 mm
880975-212	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm、9.4 mm×250 mm
820950-917	ZORBAX SB-Phenyl Guard 5 μm、4.6 mm×12.5 mm 4個組 (ZGC)
861753-912	ZORBAX SB-Phenyl ナローボア RR 3.5 μm、2.1 mm×100 mm
861953-912	ZORBAX SB-Phenyl RR、4.6 mm×100 mm、3.5 μm

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan  
July 10, 2008  
5989-8542JAJP