

Application Note No. 720001262J

はじめに

トリアリルメタン色素は、化学工業、製薬、ライフサイエンス分野など幅広いアプリケーションで使用されています。右に示した1~6のトリアリルメタン色素は、染色用色素^{1,2}、インク用色素^{3,4}、pH指示薬など産業界で応用される以外にも医療分野で、たとえば光化学療法用の試薬⁵や結合試薬(ニコチン性アセチルコリン受容体のため)⁶などにも使用されています。Patent Blue VF **2**とV **3**注射液は、現在ではリンパ管の染色のために使用されています^{7,8}。

色素を分析する方法としては、クロマトグラフィによる分離⁹が現在最も多く用いられていますが、色素を合成時の副生成物から分離する、あるいは調合済みの製品から分離して分析するような場合は一般的に困難でしかも作業時間が長くかかります⁹。

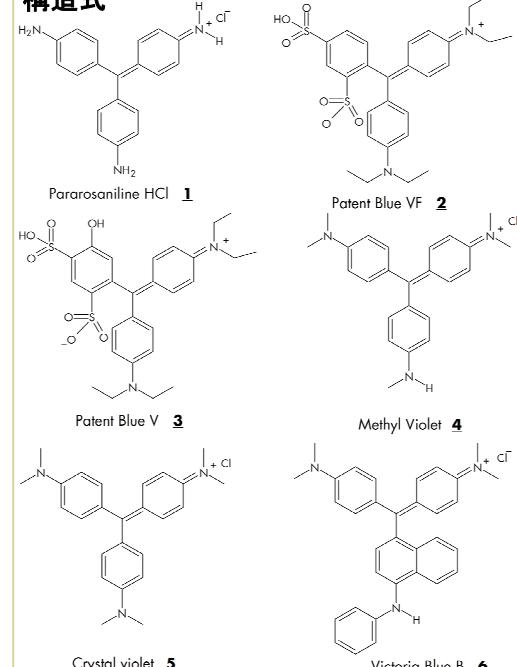
このような分析では、類似した化学構造を持つ物質を分離するために複数の溶媒組成を用いたグラジェント溶出が必要となり、HPLCの標準的な分析法で約20~30分程度の分析時間が必要となります^{3,4,10}。

このアプリケーションノートでは、数種類のボールペン(メーカー3社)の筆記痕から抽出したボールペンインク色素を6種類の標準色素(**1**~**6**)と比較しました。この分析ではWaters ACQUITY Ultra Performance LC™システムを使用することにより、シンプルな移動相を用いた1分間のグラジェント溶出で色素標準を簡単に分離することができます。

法医学分析では、インクの種類を識別するだけではなく文書が書かれた時期の特定も要求されます。インク色素を迅速に識別する能力は文書上のペンインク分析を大きく前進させるものです。



構造式



分析条件

LC 条件

LC システム :	Waters ACQUITY UPLC	
カラム :	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1×50 mm, 1.7 μm	
カラム温度 :	50 °C	
流速 :	1.0 mL/min	
注入量 :	10 μL パーシャルループ 前後に 4 μL のエアギャップ	
移動相 A :	95v% 10 mM 酢酸アンモニウム 5v% CH ₃ CN	
移動相 B :	5v% 10 mM 酢酸アンモニウム 95v% CH ₃ CN	
グラジェント :	時間[min]	B%
	0.00	20
	1.00	80
	1.01	20
洗浄用溶媒 :	CH ₃ CN 5%水溶液 500 μL (弱) CH ₃ CN 50%水溶液 50 μL (強)	
シール洗浄 :	CH ₃ CN 10%水溶液 5 min	

検出器条件

検出器 :	Waters 2996	
検出範囲 :	280-700 nm	
取り込み速度 :	20.0 points/s	
フィルタ定数 :	0.1 s	
自動露出 :	ON	
656 nm 補間 :	ON	

サンプルの準備

色素:

Pararosaniline (1), Patent Blue VF (2), Patent Blue V (3), Crystal Violet (5), Victoria Blue B (6)は Sigma-Aldrich より購入したものを用いました。Methyl Violet (4)は Crystal Violet の既知の不純物であるため、これを用いました。

1.25%酢酸:CH₃CN=70:30v/v%溶媒に色素1~6を溶解および希釈して0.25~5 μL/mLの標準液セットを作成しました。標準液セットはスクリューキャップ 13x32 mm UPLC マキシマムリカバリーバイアル(186000327c)に収めました。

インクの抽出:

20ポンドのXEROX multipurpose 4200 paperに、それぞれのボールペンを用いて1 cmの線を10本描き入れました。この紙を0.5x1 cmのサイズに切り取り、500 μLの溶媒(1.25%酢酸:CH₃CN=70:30v/v%)が入ったスクリューキャップ UPLC サンプルバイアルに投入しました。このバイアルをClay Adams Nutator Mixerで1時間静かに回転させました。この溶液をスクリューキャップ UPLC マキシマムリカバリーバイアルに移して分析に用いました。

図 1. 6種類のトリアリルメタン色素のクロマトグラム

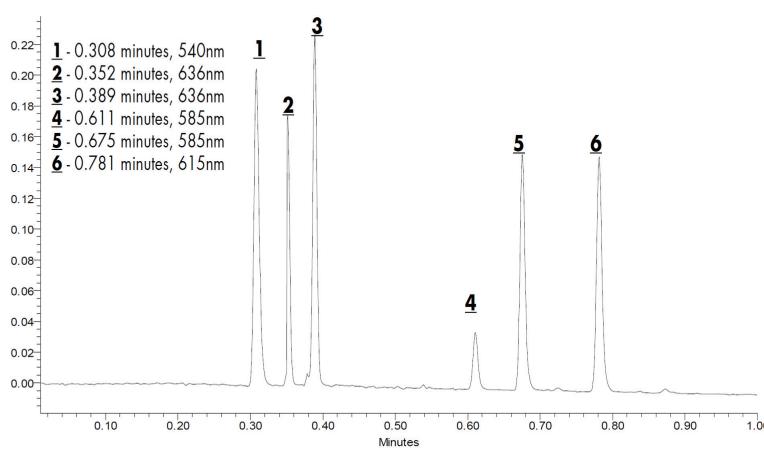


図1に、溶出時間とともに各成分のUV maxに検出波長を変化させて取得したクロマトグラムを示します。

0.25 μg/mLから5 μg/mLまでの濃度に調製した6種類のトリアリルメタン色素混合液(1~6)は、相互に化学構造が類似しているにもかかわらず、1分以内に分離できました。

ACQUITY UPLC システムを使用してこれらの色素を分離した場合、通常の HPLC での分析時間を1/20から1/30まで減らすことができます。サンプルは1から6までの番号順に溶出し、検出限界は< 0.05 μg/mLと推定されます。

図2. 青色ボールペン筆記痕抽出物の分析

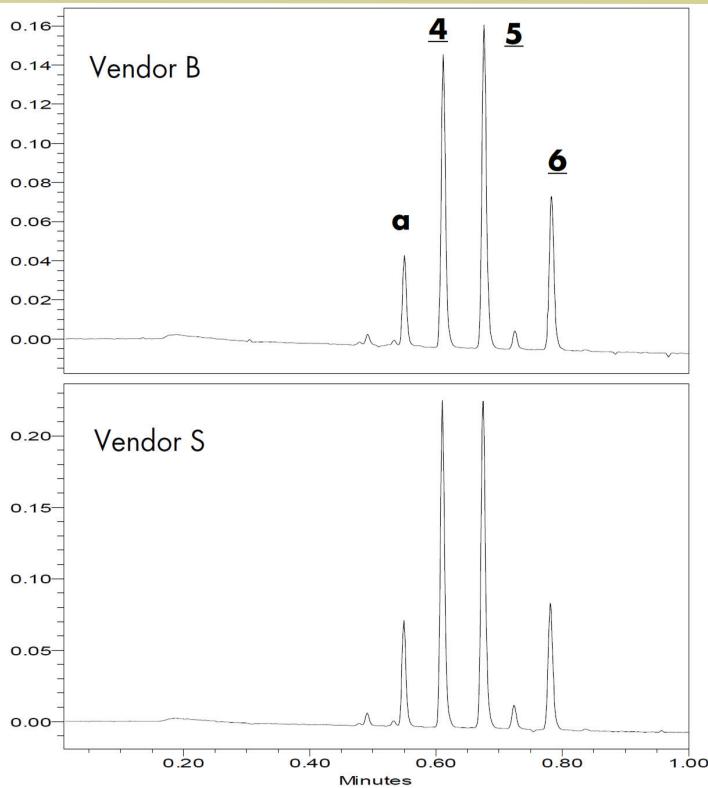


図3. 黒色ボールペン筆記痕抽出物の分析

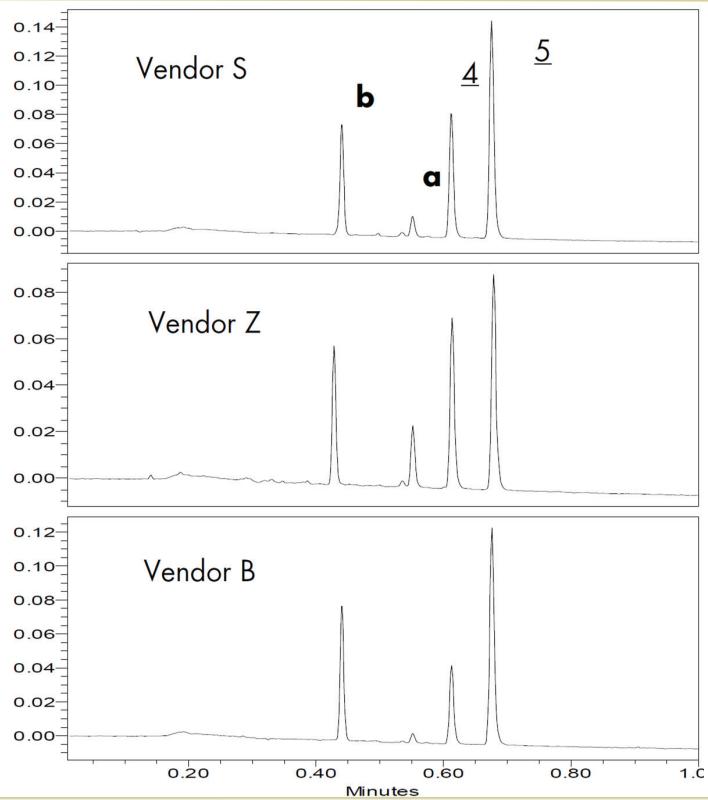


図2に、青色ボールペンの筆記痕から抽出したサンプルについて、測定波長を時間によって変化させて(574, 585, 615 nm)取得したクロマトグラムを示します。両社のインクとも同成分(Methyl Violet (4)、Crystal Violet (5)、Victoria Blue B (6))から調合されていますがピーク強度比は異なります。この差異を利用して製造元を区別することができます。

ただし、成分 a (UV max = 574 nm)は標準試料に含まれておらず、ここでは同定することができませんでした。

図3に、黒色ボールペンの筆記痕から抽出したサンプルについて、測定波長を時間によって変化させて取得したクロマトグラムを示します。黒色ボールペンの筆記痕抽出物は4種類の成分を含んでおり、そのうちの2つはMethyl Violet (4)およびCrystal Violet (5)と合致しました。他の2つの成分aおよびb (UV max = 420 nm)は標準試料には含まれていない成分であり、同定できませんでした。更に詳細情報を得るにはMS検出器が有効と考えられます。筆記に使用された黒色ボールペンを、ピーク強度の相対的な差異によって識別できる可能性は高く、犯罪捜査分析への応用が可能と思われます。

結論

ACQUITY UPLC™カラム技術を使用した Waters ACQUITY UPLC™システムを使用することにより、非常に類似した化学構造を持つ数種類のトリアリルメタン色素をわずか 1 分以内に高感度でベースラインから分離することができます。ACQUITY UPLC では、ボールペン筆記痕抽出物の分析を従来の HPLC システムと比較して 20~30 倍高速に処理でき、さらに UV/PDA 検出を併用することにより種類の異なるペンによる筆記痕を明瞭に区別することができます。

参考文献

1. L. Balko, J. Allison, *J Forensic Sci.*, 48, 1-7, 2003.
2. D. Kumar, AC Singh, P. N. Usha, R. Tandon, K. Tripathi, *JAPI*, 53, 312-313, 2005.
3. J. Andrasko, *J Forensic Sci.*, 46, 21-30, 2001.
4. A. A. Kher, E. V. Green, M. I. Mulholland, *J Forensic Sci.*, 46, 878-883, 2001.
5. GL. Indig, GS. Anderson, MG. Nichols, JA. Bartlett, WS. Mellon, F. Sieber, *J. Pharm. Sci.*, 89, 88-89, 2000.
6. M. M. Lurtz, S. E. Pedersen, *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 55, 159-167, 1999.
7. *J. Nucl. Med.*, 44, 649, 2003.
8. D. Kumar, AC Singh, P. N. Usha, R. Tandon, K. Tripathi, *JAPI*, 53, 312-313, 2005.
9. J. A. Zlotnick, F. P. Smith, *J Chromatogr., B* 733, 265-272, 1999.
10. V. F. Samanidou, K. I. Nikolaidou, I. N. Papadoyannis, *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27, 215-235, 2004.

For Complete ♊ Confidence

Waters

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第 5 小池ビル

TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 カトキチ新大阪ビル 11F

TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

