ApplicationNOTE

Waters

ACQUITY UPLC™/PDAによる 発ガン性が疑われる芳香族アミン化合物の分析

Application Note No. 720001462J

概要

芳香族アミンは染料、ポリマー、界面活性剤、医薬品、農薬、腐食防止剤などの製造のための原料として用いられます[1)-3)]が、多くの芳香族アミン化合物に対し発ガン性が疑われています[4)-6)]。例えばベンジジン(1)、2-ナフチルアミン(11)や4-アミノジフェニル(16)は膀胱ガンを引き起こす可能性が指摘されています。[4)]他にも発ガン性が疑われるアミン化合物は繊維・皮革・化粧品・染髪量に使用されるアゾ染料[7)-9)]や酸化染料[4),10)]中に存在する可能性があります。US FDAには食品着色料(アゾ化合物)中の芳香族アミンに関する規制(21 CFR 74.705と21 CFR 74.706) があり、EUでもそのようなアゾ色素の使用を規制しています(2002/61/EC)。[1)4)]EUでは22種のアミン化合物[5)6)11)]を生成する可能性のあるアゾ化合物の繊維・皮革製品への使用を禁止しています。この法令では少なくとも2通りの異なったクロマトグラフィの分析法が必要とされています。アミン化合物は高極性なのでGCによる定量分析は困難であり、LCでは近年50分～75分の逆相系分析条件が報告されました。[1)5)9)]

このアプリケーションノートではACQUITY UPLC™/ PDAシステムを用いて使用が禁止されているアミン化合物19種を7.5分で分析した例についてご紹介します。この従来法に比べ10倍ほど迅速な発ガン性アミン化合物の分析手法は、原料や製品の品質管理にかかる時間を大幅に短縮し、製品のリコールの回避や作業者の健康を守るために役立つと考えられます。

サンプルの準備

芳香族アミン19化合物をメタノールに溶解し、100μg/mLの原液を作製しました。150μLの原液と150μLのメタノール、700μLの蒸留水を混合し、15μg/mLの試料溶液を作製しました。

Acquity™ Ultra Performance LC

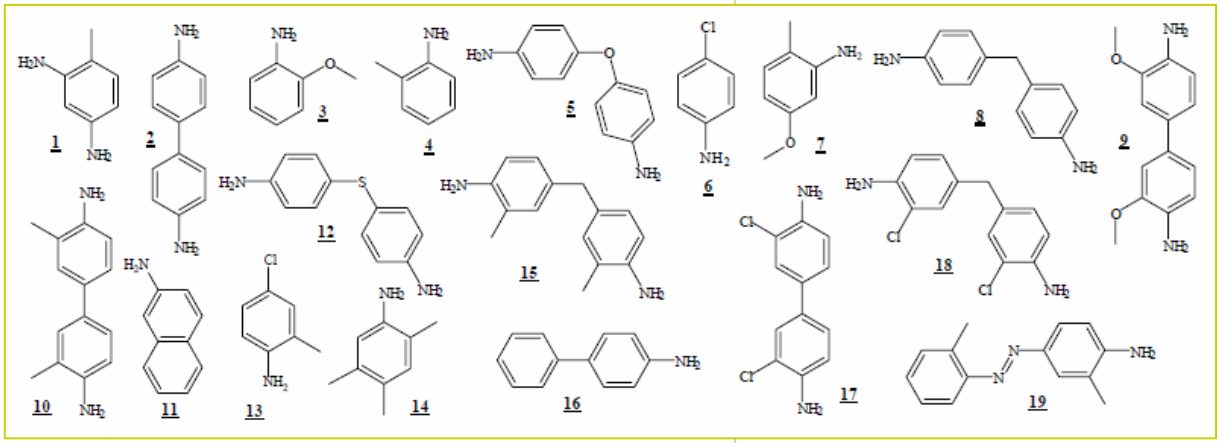
分析条件

装置

Waters ACQUITY UPLC™ PDAシステム

ソフトウエア:	Empower software
カラム温度:	50℃
流速:	0.5mL/min.
グラジェント:	5%Bから100%Bまで7分
注入量:	2.5 μl
測定波長:	PDA 215-500nm
サンプリング速度:	10pts/s
フィルタレスポンス:	0.1s
メソッド(1)	
カラム:	ACQUITY UPLC BEH™ C8 2.1×100 mm , 1.7 μm
移動相:	A)[0.575g,$(NH_4)H_2PO_4$;0.7g, Na_2HPO_4;1000g,H_2O;pH6.9]+79.1gメタノール B)メタノール
グラジェント:	5%Bから65%(10分)
メソッド(2)	
カラム:	ACQUITY UPLC BEH™ C18 2.1×100 mm , 1.7 μm
移動相:	A)10mM酢酸アンモニウム /(水/アセトニトリル 95/5v%) B)アセトニトリル
グラジェント:	5%Bから60%(10分)

構造式



1 4-Methyl-m-phenylenediamine
2 Benzidine
3 o-anisidine
4 o-toluidine
5 4,4'-oxydianiline
6 4-chloroaniline
7 6-meththoxy-m-toluidine
8 4,4'-methylenedianiline
9 3,3'-dimethoxybenzidine
10 3,3'-dimethylbenzidine
11 2-naphthylamine
12 4,4'-thiodianiline
13 4-chloro-o-toluidine
14 2,4,5-trimethylaniline
15 4,4'-methylenedi-o-toluidine
16 4-aminobiphenyl
17 3,3'-dichlorobenzidine
18 2,2'-dichloro-4,4'-methylene -dianiline
19 o-aminoazotoluene

EU 2002/61/ECでは30mg/kgを限界値としており少なくとも2つの異なるメソッドで分析するように定められています。このアプリケーションノートではC18とC8カラムを用いたメソッドが使用されました。図1は15μg/mlのアミン化合物を分析したクロマトグラムです。C8カラムを使用し構造が類似した19成分を分離しています。このメソッドは従来法[5]に比べ1/7の分析時間となっており、消費する移動相溶媒量も1/14になっています。

図1.アミノ化合物19成分のUPLC™/PDAクロマトグラム (ACQUITY BEH C_8 2.1x100mm カラム, 240nm)

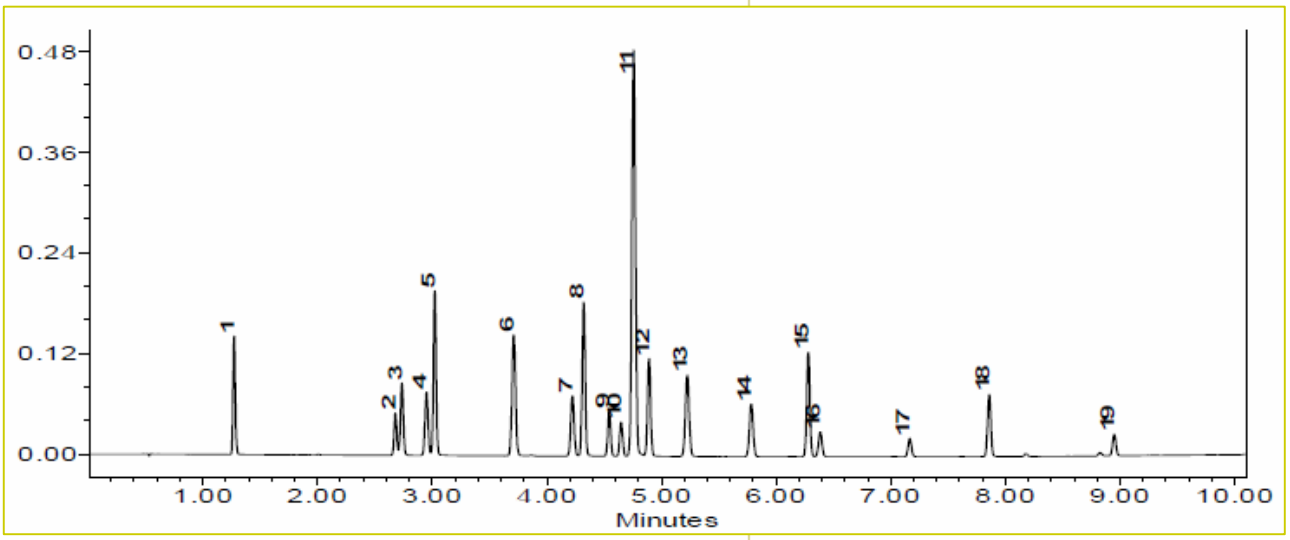


表1. PDAライブラリマッチの結果(C8カラムによる分離)

	ピーク名	RT	マッチ1スペクトル名	マッチ1アングル	マッチ1許容差	純度1アングル	純度1許容差
1	1	1.271	4-methyl-m-phenylenediamine	0.112	1.195	0.202	0.501
2	2	2.678	Benzidine	0.099	1.185	0.257	0.434
3	3	2.735	o-anisidine	0.452	1.626	4.027	0.787
4	4	2.950	o-toluidine	0.247	1.567	0.395	0.748
5	5	3.022	4,4-oxydianiline	0.148	1.306	0.329	0.543
6	6	3.711	4-chloroaniline	0.225	1.568	0.408	0.749
7	7	4.223	6-methoxy-m-toluidine	0.292	1.667	0.528	0.889
8	8	4.321	4,4-methylenedianiline	0.170	1.364	0.285	0.593
9	9	4.544	3,3-dimethoxybenzidine	0.136	1.280	0.207	0.486
10	10	4.648	3,3-dimethylbenzidine	0.160	1.331	0.233	0.504
11	11	4.757	2-naphthylamine	0.085	1.132	0.143	0.366
12	12	4.892	4,4-thiodianiline	0.183	1.334	0.330	0.598
13	13	5.225	4-chloro-o-toluidine	0.270	1.706	0.577	0.975
14	14	5.783	2,4,5-trimethylaniline	0.337	1.844	0.555	0.965
15	15	6.281	4,4-methylenedi-o-toluidine	0.226	1.513	0.425	0.780
16	16	6.385	4-amionbiphenyl	0.178	1.440	0.415	0.730
17	17	7.166	3,3-dichlorobenzidine	0.201	1.333	0.422	0.668
18	18	7.859	2,2-diCl-4,4-methylene-dianili	0.290	1.580	0.597	1.004
19	19	8.950	o-aminoazotoluene	0.209	1.426	0.385	0.612

PDA検出器はクロマトグラフィ分析の強力なツールとして用いられており、[12),13)]成分同定のために有用な情報を与えます。
表1はPDAライブラリマッチの結果です。Empowerソフトウエアでは、マッチアングル値が許容差より小さいとライブラリとの一致度が高いことを示し、純度アングル値が純度許容差より小さいとピーク純度が高いことを示します。各ピークのマッチアングルとマッチ許容差、純度アングルと純度許容差は、1-19の成分がきちんと分離され、PDAライブラリに登録されたスペクトルとよく一致していることを示しています。

図2.PDAデータから抽出された2,5,11,16,19のUVスペクトル

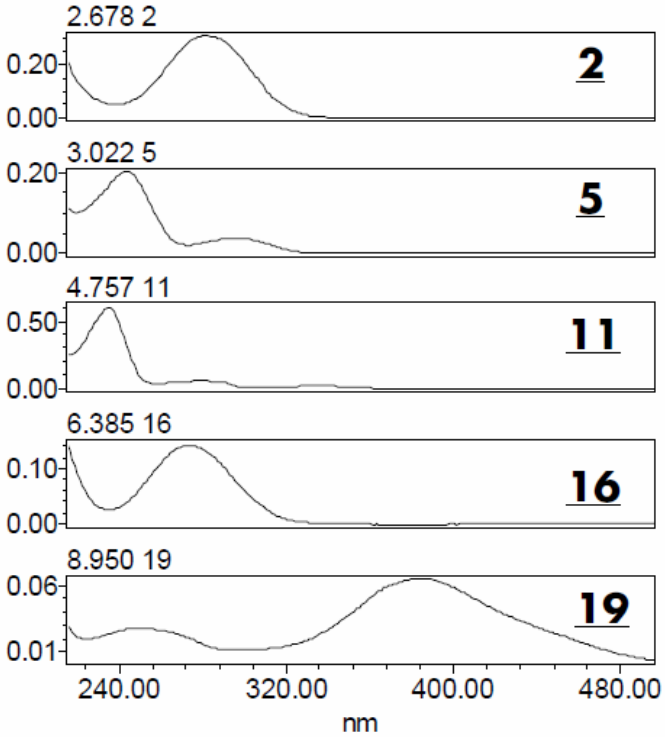


図2はPDAデータから抽出された化合物2、5、11、16、19のUVスペクトルです。Empowerソフトウエアでは標準化合物のUVスペクトルと保持時間を用いて容易にライブラリが作成できます。そのライブラリによって自動ライブラリマッチングと高速製品スクリーニングが可能です。

Waters

図3. アミノ化合物19成分のUPLC™/PDAクロマトグラム (ACQUITY BEH C_{18} 2.1x100mm カラム, 240nm)

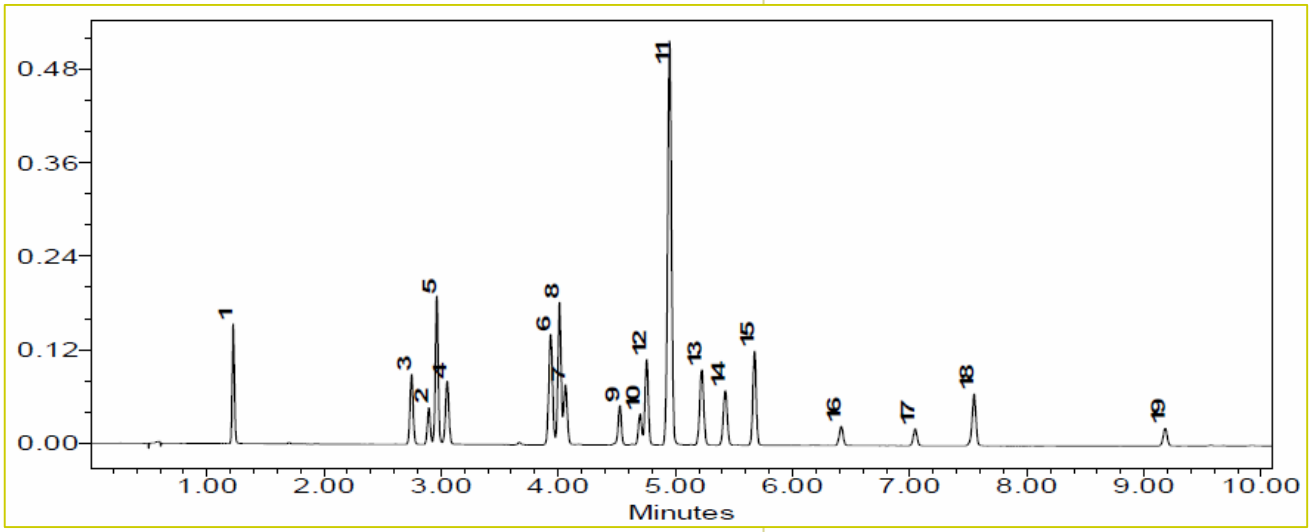


図4にはC18カラムを用いたクロマトグラムを示します。分析時間10分で19成分を分析しています。この条件では移動相に酢酸アンモニウムを用いているので、リン酸バッファを用いた図1の条件よりもLC/MS分析に適しています。この条件を用いてUPLC™とシングル四重極MSを組み合わせればより確実な分析結果が得らることが期待されます。

まとめ

ACQUITY UPLC™によって19種類のアミン化合物を高感度に高速で分離することができます。このメソッドでは従来法よりも1/7の時間でで分析することができ、溶媒消費量は1/14以下になります。またEmpowerソフトウエアのPDA機能を利用した同定手法はさらに解析時間を短縮します。この芳香族アミン化合物の分析手法はアゾ化合物、繊維、皮革、ポリマー添加剤、食品用色素や化粧品などへの応用が可能です。

1. L. H. Ahlstrom, et al., *Anal Bioanal Chem.*, 382, 1320-1327, 2005.
2. S. Lacorte, et al., *J. Chromatogr.* A, 833, 181-194, 1999.
3. M. Shelke, et al., *J. Chromatogr.* A, 1089, 52-58, 2005.
4. R. J. Turesky, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1162-1173, 2003.
5. The European Standard EN 14362-1 and 2: 2003
6. ISO/TS 17234: 2003 (E).
7. A. Pielesz, et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 42-47, 2002.
8. M. Bhaskar, et al., *J. Chromatogr.* A, 1018, 117-123, 2003.
9. C. S. Eskilsson, et al., *J. Chromatogr.* A, 955, 215-227, 2002.
10. U. Vincent, et al., *J. Cosmet. Sci.*, 53, 43-58, 2002.
11. Amines **1** to **19** and the following three amines are in the EU list of 22 banned aromatic amines: 5-nitro-o-toluidine [99-55-8], **20**; 4-aminoazobenzene [60-09-3], **21**; and 4-methoxy-m-phenylenediamine [615-05-4], **22**. Under the sample preparation condition of EU methods (EN 14362-1 & 2), amines **19** and **20** are further reduced to **1** and **4**; and **21** is reduced to aniline and 1,4-phenylenediamine. Amine **22** was not in the test mixture because it was not available from several major vendors for common chemical reagents in USA.
12. M. V. Gorenstein, et al., LC-GC, 12, 768-772, 1994.
13. Peak Identification with Waters 996 Photodiode Detector (PDA): Library Matching, Waters Corporation, Waters Performance PerSPECtives, WPP12, Library No. 960405.

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

LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE ISO9001
UKAS QUALITY MANAGEMENT 001
VIT