

保持型液液抽出 Chem Elut S カートリッジを用いた GC/MS によるアゾ染料由来芳香族アミンの定量

著者

Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Chem Elut S は、合成充填剤を使用した保持型液液抽出 (SLE) 用のサンプル前処理製品です。今回の研究では Chem Elut S カートリッジを使用し、欧州メソッド ISO 14362-1 に従ってアゾ染料に由来する芳香族アミンの定量分析を行いました。芳香族アミンを含むクエン酸ナトリウム/水酸化ナトリウム溶液をカートリッジにロードして 15 分間保持した後、メチルtert-ブチルエーテル (MTBE) を用いて溶出することで、GC/MS 分析用の抽出物が得られました。このメソッドでは、3 種類の SLE カートリッジフォーマットについて 30 µg/mL の濃度のアミンを測定し、すべてで高い回収率 (87 ~ 119 %) と優れた再現性 (< 9 % RSD) を得ることができました。結果から、Chem Elut S が芳香族アミン測定のための高性能 SLE 製品であることが示されました。

はじめに

アゾ染料は、業界で広く利用されている染色剤で、合成染色剤全体の3分の2を占めています¹。繊維、食品、薬品、化粧品などの多くの商品で、着色料として使用されています。一部のアゾ染料は、発がん性芳香族アミンへの還元分解が原因で生じる環境有害性のために、繊維業で使用が禁止されています²。

繊維中のアゾ染料に由来する芳香族アミンの定量について、欧州メソッド ISO 14362-1 に概要が示されています³。アゾ染料は、クロロベンゼンの還流を使用して織物から抽出した後、乾燥させます。抽出残留物はクエン酸ナトリウム/水酸化ナトリウム緩衝液とジオチン酸ナトリウムで処理して、アゾ染料を芳香族アミンに還元します。今回の研究では、適切な芳香族アミンをブランクのクエン酸ナトリウム/水酸化ナトリウム溶液にスパイクして、Chem Elut S の抽出回収率と再現性を評価しました。

従来の SLE では、ケイソウ土 (DE) が充填されたカートリッジに水溶性サンプルをロードします。これにより、充填剤の表面に水溶性サンプルの薄膜が形成されます。その後、非水溶性の溶媒を SLE 充填剤に通液すると、サンプルからターゲット成分が効率的に抽出され、後処理ありまたは後処理なしの分析用のコレクションチューブに溶出されます。その結果、時間と労力が大幅に軽減されるうえ、ユーザー間の再現性が向上します。

Chem Elut S 製品で使用される合成充填剤は、従来の DE 充填剤の問題を克服できるように最適化されています。形状が不規則ではらつきが大きく、細粒のある DE 粒子とは異なり、Chem Elut S の粒子は粒子サイズ分布が狭く、細粒はありません。これにより、最適な通液特性が得られ、再現性が向上します。また、Chem Elut S は DE 充填剤よりもサンプル保持力が強く、効率的にサンプルを吸着し、サンプルのブレイクスルーの可能性を低減します。5 mL, 20 cc, 10 mL, 60 cc, 20 mL, 60 cc の3種類の大容量 Chem Elut S カートリッジを操作して自然落下でローディングと溶出を行い、ワークフローを簡素化しました。

Chem Elut S カートリッジと GC/MS (SIM) 検出を使用したこのワークフローでは、芳香族アミンの高い回収率と再現性が実証されました。

実験方法

試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。MTBE は VWR-BDH Chemicals 社 (米国ペンシルベニア州ラドナー) から入手しました。クエン酸ナトリウム二水和物 (Sigma-Aldrich 社、米国ミズーリ州セントルイス) を使用し、水で 0.06 M のクエン酸緩衝液を調製しました。次亜硫酸ナトリウムは、Sigma-Aldrich 社から入手し、毎日 200 mg/mL 溶液に調製しました。水酸化ナトリウムは、50% 水溶液のものを Sigma-Aldrich 社から入手しました。芳香族アミンおよび内部標準は、原液標準調製用の未希釈の固体および液体のものを Sigma-Aldrich 社および AccuStandard 社 (米国コネチカット州ニューヘブーン) から購入しました。表 1 に、ターゲットアミンのリテンションタイム、CAS 番号、GC/MS イオンをまとめています。

標準および溶液の調製

必要に応じて、原液をアミンごとに水溶液または DMSO で 10 mg/mL の濃度で個別に調製しました。その後、これらの標準溶液を混合してキャリブレーションおよびサンプルスパイク用の作業用標準溶液を作成しました。

サンプル前処理機器および消耗品

- Agilent Chem Elut S 5 mL, 20 cc (p/n 5610-2009)
- Agilent Chem Elut S 10 mL, 60 cc (p/n 5610-2010)
- Agilent Chem Elut S 20 mL, 60 cc (p/n 5610-2011)
- 40 および 150 mL ガラス採取ボトル
- エッペンドルフピペット

分析条件

- Agilent 7890 GC
- Agilent 5977 GC/MSD

Agilent 5977 GC/MSD パラメータ	
GC カラム	Agilent J&W DB-35ms、30 m × 250 μm × 0.250 μm (p/n 122-3832)
ライナ	ウルトライナートシングルテーパ、スプリットレス、ウール入り (p/n 5190-2293)
注入量	1 μL
注入口温度	280 °C
流量	2 mL/min、定流量
オープン温度	100 °C、10 °C/min で 320 °C まで
補助ガス温度	320 °C
MS ソース	250 °C
四重極温度	180 °C
MS モード	SIM (イオンについては表 1 を参照)

表 1. ターゲットアミンと内部標準、リテンションタイム、SIM パラメータ、回収率のスペック³

成分	CAS No.	リテンションタイム (分)	定量イオン (m/z)	確認イオン 1 (m/z)	確認イオン 2 (m/z)	% 回収率の スペック ³
o-トルイジン	95-53-4	2.783	106	107	89	> 50
4-クロロアニリン	106-47-8	4.511	127	129	100	> 70
2,4,5-トリメチルアニリン	137-17-7	4.872	120	135	134	> 70
p-クレシジン	120-71-8	5.224	122	137	94	スペックなし
3-クロロ-o-トルイジン	87-60-5	5.585	141	106	140	> 70
4-クロロ-o-トルイジン	95-69-2	5.700	141	106	140	> 70
2,4-ジアミノトルエン	95-80-7	7.271	121	122	94	> 50
3-ニトロ-p-トルイジン	119-32-4	9.268	152	107	135	> 70
2-ナフチルアミン	91-59-8	9.326	143	115	116	> 70
2-アミノピフェニル	90-41-5	9.427	169	168	167	> 70
4-アミノピフェニル	92-67-1	11.591	169	168	170	> 70
アントラセン-d ₁₀	1719/06/08	11.784	188	184	189	I.S.
p-アミノアゾベンゼン	60-09-3	15.200	197	92	120	> 70
4,4'-オキシジアニリン	101-80-4	15.836	200	171	108	スペックなし
4,4'-ジアミノジフェニルメタン	101-77-9	15.937	198	197	106	> 70
ベンジジン	92-87-5	16.012	184	185	92	> 70
3,3'-ジメチル-4,4'-ジアミノジフェニルメタン	838-88-0	17.363	226	211	120	スペックなし
3,3'-ジメチルベンジジン	119-93-7	17.623	212	213	106	スペックなし
4,4'-チオジアニリン	139-65-1	18.520	216	184	215	> 70
4,4'-メチレンビス (2-クロロアニリン)	101-14-4	18.856	231	266	195	スペックなし
3,3'-ジメトキシベンジジン	119-90-4	18.973	244	201	229	スペックなし

サンプル前処理

サンプル前処理手順ISO 14362-1 に記載されている E.4.6. チェックプロトコルで、芳香族アミンの SLE 抽出効率を測定します³。溶液は、水酸化ナトリウムを用いて pH 6 に調製された 0.06 M クエン酸ナトリウムで準備しました。次に、サンプルに芳香族アミンを 30 µg/mL でスパイクして、SLE 抽出の前に十分に混合しました。アミンを添加した後、溶液は鮮やかなオレンジ色/黄色になりました。

SLE 手順

1. Chem Elut S カートリッジをコレクションチューブ/ボトルとともにセットアップ
2. サンプルをカートリッジ上に移し、自然落下でロード (量は表 2 を参照)
3. サンプルを充填剤中に 15 分間保持
4. メチルtert-ブチルエーテルを用いて自然落下で溶出 (量は表 2 を参照)
5. 溶出液を攪拌し、GC/MS SIM 分析用にオートサンプリングバイアルに分注

回収率と再現性の評価

Chem Elut S の芳香族アミン用プロトコルを、回収率と再現性についてテストしました。EN メソッドで提示されているように、各カートリッジを用いて 30 µg/mL で 3 回繰り返し分析しました³。同位体標識された内部標準 (IS) のアントラセン-d₁₀ を 30 µg/mL でスパイクして、正確な容量補正を行いました。SLE 手順で示すように、MTBE を用いてキャリアントを 7.5 µg/mL で調製し、4倍に希釈しました。

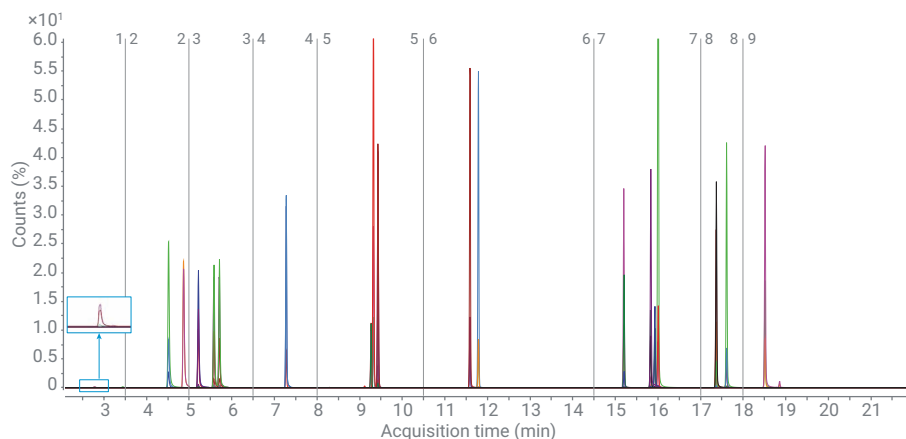


図 1. 20 種類の芳香族アミンと IS の 7.5 µg/mL での GC/MS SIM クロマトグラムの重ね表示

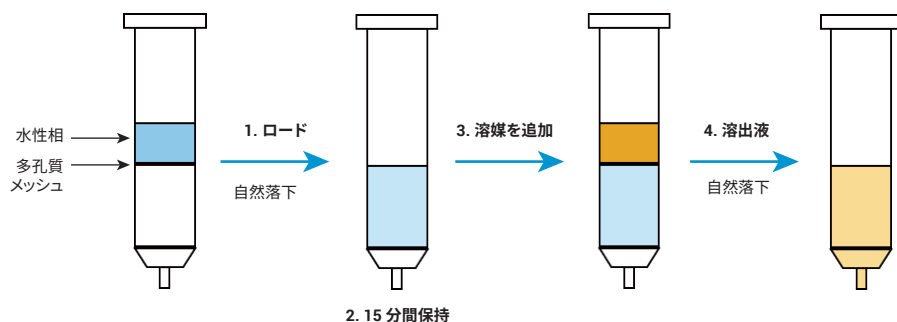


図 2. 一般的な Agilent Chem Elut S のワークフローの概略図。4 ステップで構成。
1) 自然落下でサンプルをロード、2) サンプルを SLE 充填剤で 15 分間保持、
3) 対象成分の抽出のために非水溶性溶媒を追加、4) 自然落下で有機溶媒を溶出

表 2. 芳香族アミン SLE 抽出のためのカートリッジのロード量および溶出量

カートリッジ	部品番号	ロード量 (mL)	溶出量 (mL)
5 mL, 20 cc	5610-2009	5	20
10 mL, 60 cc	5610-2010	10	40
20 mL, 60 cc	5610-2011	20	80

結果と考察

回収率と再現性の結果

表 3 に示すように、優れた結果が得られました。テストした 3 種類すべての Chem Elut S において、回収率は 87 ~ 119 % で、% RSD は 9 未満でした。*p*-アミノアゾベンゼン、4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン)、3,3'-ジメトキシベンジジンでは、SLE 保持時間を 15 分に延長することで回収率が 29 ~ 38 % 向上しました(図 3)。合成および DE-ベース SLE チューブの両方で、回収率の向上が示されました。すべての大容量カートリッジが非常に良好に機能し、特に 10 mL, 60 cc チューブでは優れた再現性が実証されました。

Chem Elut S によるサンプル前処理

Chem Elut S チューブでは、簡単な操作で迅速に、芳香族アミンに対して高い成分回収率と精度が得られました。Chem Elut S の合成充填剤の製造には、高いサンプル保持力、均一な充填、バッチ間で一貫性のある再現性、最適な通液性が確保されるように、細心の注意が払われています。Chem Elut S 5 mL, 20 cc、10 mL, 60 cc、20 mL, 60 cc カートリッジは、自然落下でサンプルロードと溶出ができるように設計されており、操作が簡単です。また、このアプリケーションでは 15 分の保持時間が利点となり、すべての成分について非常に優れた回収率を実現しています。性能特性については、DE-ベース充填剤と直接比較では一致しています。これらの機能により、優れたデータ品質、使いやすさ、マトリックス除去(つまり塩分除去)を実現します。

表 3. Agilent Chem Elut S による発がん性芳香族アミンの回収率と再現性

成分	Chem Elut S フォーマット					
	5 mL, 20 cc		10 mL, 60 cc		20 mL, 60 cc	
	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD
o-トルイジン	96.8	5.7	91.9	2.4	91.3	4.5
4-クロロアニリン	98.6	3.7	91.3	0.7	92.2	4.7
2,4,5-トリメチルアニリン	98.8	3.9	92.2	0.8	93.8	4.3
<i>p</i> -クレシジン	96.9	4.3	90.6	0.8	91.3	3.9
3-クロロ-o-トルイジン	97.8	3.7	91.0	1.0	92.3	4.4
4-クロロ-o-トルイジン	96.4	3.9	89.8	0.6	90.7	4.7
2,4-ジアミノトルエン	96.7	4.4	90.7	0.7	90.6	4.2
3-ニトロ-p-トルイジン	99.8	4.7	95.0	0.8	94.9	5.0
2-ナフチルアミン	97.8	4.3	91.7	0.8	93.0	5.1
2-アミノビフェニル	96.4	3.4	90.7	0.6	92.8	4.4
4-アミノビフェニル	97.9	4.3	93.5	0.6	94.1	4.5
<i>p</i> -アミノアゾベンゼン	98.9	6.2	96.2	0.5	95.3	4.1
4,4'-オキシジアニン	112.9	6.5	109.5	0.8	107.7	5.8
4,4'-ジアミノジフェニルメタン	99.5	6.1	95.3	0.6	95.0	5.5
ベンジジン	116.4	5.6	110.4	1.3	111.7	6.1
3,3'-ジメチル-4,4'-ジアミノジフェニルメタン	119.6	2.4	114.0	0.5	113.1	5.3
3,3'-ジメチルベンジジン	103.4	5.4	96.8	0.4	96.8	5.7
4,4'-チオジアニン	107.4	5.9	101.9	1.0	99.7	5.9
4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン)	107.2	5.8	101.6	1.0	99.6	5.7
3,3'-ジメトキシベンジジン	91.6	6.1	91.5	8.2	87.1	5.8

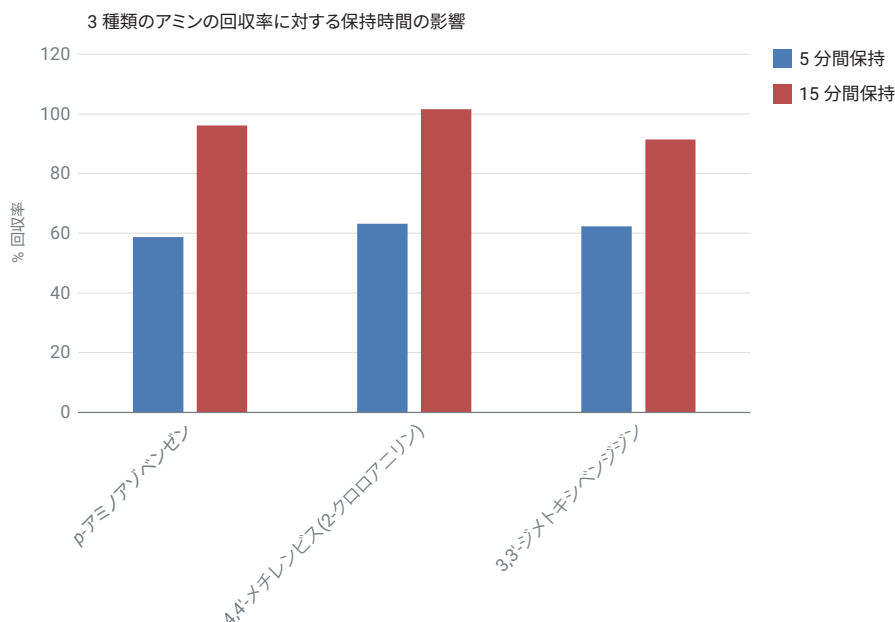


図 3. 3 種類の芳香族アミンの回収率に対する保持時間の影響を調べる実験。Agilent Chem Elut S 10 mL, 60 cc チューブを用いて 30 µg/mL のアミンを含むサンプルを抽出 (n = 3)

結論

Agilent Chem Elut S で使用されている合成充填剤により、優れた一貫性と高い水溶性サンプル保持力を得られます。今回の実験で、Chem Elut S は、ISO 14362-1 に概要が示されているアゾ染料に由来する芳香族アミンを優れた回収率と再現性で定量できました。テストした 3 種類の大容量 Chem Elut S カートリッジすべてで優れた性能が示され、20 種類の芳香族アミンすべてについて、87 ~ 119 % の回収率と 9 % 未満の RSD が得られました。Chem Elut S のサンプル前処理は、他のサンプルや成分に対しても有用で、他のアジレントアプリケーションでも取り上げられています。

参考文献

1. Freeman, H. S. Aromatic Amines: Use in Azo Dye Chemistry. *Front. Biosci.* (Landmark Ed.) **2013**, *18*, 145-164.
2. Pielesz, A.; *et al.* Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2002**, *53*(1), 42-47.
3. Textiles - Methods for Determination of Certain Aromatic Amines Derived from Azo Colorants - Part 1: Detection of the Use of Certain Azo Colorants Accessible with and Without Extracting the Fibres. EN 14362-1:2012, Feb. **2012**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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. 2019
Printed in Japan, June 24, 2019
5994-0951JAJP