報 文

水溶性シッフ塩基へのマーキングゾーン誘導体化/逆相分配高速液体クロマトグラフィーによる *n*-アルキルアミン類の分離定量

高柳 俊夫^{®1}, Rim DRIOUICH¹, 澤井 邦子¹, Qiong Li¹,
大島 光子¹, 本水 昌二¹

Separation and determination of *n*-alkylamines by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with merging zone derivatization to water-soluble Schiff bases

Toshio TAKAYANAGI¹, Rim DRIOUICH¹, Kuniko SAWAI¹, Qiong Li¹,
Mitsuko OSHIMA¹ and Shoji MOTOMIZU¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushimanaka, Okayama-shi, Okayama 700-8530

(Received 23 January 2004, Accepted 29 March 2004)

Separation and determination of *n*-alkylamines were investigated with anionic aldehydes to form water-soluble Schiff bases by using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Two labeling reagents of salicylaldehyde-5-sulfonate (SAS) and 4-(4-sulfophenylazo)-1-hydroxy-2-naphthaldehyde (SPAHNA) were investigated. Sample solution containing the analytes and reagent solution were simultaneously injected and merged in the flow line, and water-soluble Schiff bases were formed in the reaction tube with its length of 5 m and at 70°C. The Schiff bases were resolved with water-methanol eluent on a reversed-phase column and photometrically detected. The entire analysis time including on-line derivatization, column separation and detection was accomplished within 25 min with SAS and 18 min with SPAHNA. The determination range for the *n*-alkylamines are 0–50 µM with the limit of detections at 0.5–1.0 µM for SAS and 0.08–0.20 µM for SPAHNA.

Keywords : *n*-alkylamines; salicylaldehyde-5-sulfonate; 4-(4-sulfophenylazo)-1-hydroxy-2-naphthaldehyde; merging zone; reversed-phase HPLC.

1 緒 言

脂肪族アミンは亜硝酸イオンと反応して発がん性のニトロソアミンを生成することがよく知られており¹⁾, 肌, 粘液, 呼吸器への刺激性にも関心が寄せられている²⁾ので, アルキルアミン類の分離定量法が必要となっている. イオン交換カラム³⁾, 逆相分配カラム⁴⁾を用いてアルキルアミン類を分離検出するクロマトグラフ法が報告されている. フロー分析法はオンライン誘導体化などの分析操作を自動

化し, 検出感度, 再現性, 試料量, 分析時間等を改善することができる^{5)~7)}. また, 安定な送液速度と配管内容積に基づき, そこを流れる溶液の滞在時間/誘導体化反応の進行を制御できる. 本研究では, *n*-アルキルアミン類の分離定量法の開発を目的として, マーキングゾーン法による水溶性シッフ塩基へのオンライン誘導体化と逆相カラム分離/吸光光度定量について検討した.

アミノ基は温和な条件下でアルデヒドと反応し, 水分子の脱離を伴ってシッフ塩基を生成する^{8)~12)}. 著者らは, キャピラリー電気泳動法におけるアミノ基の陰イオン性誘導体化試薬としてサリチルアルデヒド-5-スルホン酸(SAS)

¹ 岡山大学理学部化学科: 700-8530 岡山県岡山市津島中 3-1-1

Fig. 1 Merging zone derivatization - RP-HPLC system for the determination of *n*-alkylamines as SAS- and SPAHNA- Schiff bases

P: double plunger pump; V₁ and V₂: six way valves with loop; MJ: mixing joint; RC: reaction coil (5 m); Column: TSK-GEL ODS-80T_MCTR (4.6 mm i.d. × 100 mm), D: UV-Vis detector, M: Monitor

及び4-(4-スルホフェニルアゾ)-1-ヒドロキシ-2-ナフトアルデヒド (SPAHNA) を開発した^{13)~16)}。これら誘導体化試薬を用いるプレキャピラリー誘導体化により、*n*-アルキルアミン類は対応する水溶性 Schiff 塩基に変換され、比較的短い反応時間、分析時間及び十分な感度が得られた。本研究では、上記誘導体化試薬をオンライン誘導体化試薬として用いる逆相分配高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) について検討した。試料溶液は流路にゾーンとして注入され、もう一方の流路に注入された試薬溶液とオンラインで混合されて、水溶性 Schiff 塩基を生成する。アルキル鎖長の異なる4種類の *n*-アルキルアミンは5 m, 70°C の反応コイル中で定量的に誘導体化された。諸条件の最適化により、オンライン誘導体化を含む1試料当たりの分析時間はSAS, SPAHNAを用いた場合それぞれ25分, 18分であり、検出感度も十分であった。

2 実験

2.1 装置

オンライン誘導体化を含む RP-HPLC システムを Fig. 1 に示す。送液ポンプはサヌキ工業製ダブルプランジャーポンプ (DM2M-1026) を、逆相カラムは東ソー製 TSKgel ODS-80T_MCTR (内径 4.6 mm, カラム長 100 mm) を、検出器は横河製 LC100 紫外可視吸光検出器を用い、クロマトモニター (日本フィルコン製) を用いてクロマトグラムを記録した。試料溶液注入、試薬溶液注入にそれぞれ六方バルブを用い、Y 型のミキシングジョイントで2つの流れを混合した。配管はすべてテフロン製のもの (内径 0.5 mm) を用いた。反応コイルは水浴中に浸し、アドバンテック東洋製 MTU-1 を用いて温度を制御した。

2.2 試薬

誘導体化試薬として用いた SAS 及び SPAHNA は前報により合成したもの¹³⁾¹⁶⁾を用いた。それらの構造を Fig. 2 に示す。分析対象物質として用いたアルキルアミン類 (*n*-ア

Fig. 2 Structure of labeling reagents

ミルアミン: AmA, *n*-ヘキシルアミン: HxA, *n*-ヘプチルアミン: HpA, *n*-オクチルアミン: OcA), イオン対試薬として用いた臭化テトラエチルアンモニウム (TEA⁺ Br⁻) は東京化成工業製のものを用いた。

溶離液に用いるメタノールは和光純薬製 HPLC 級のものをを用いた。溶離液の pH 緩衝液は和光純薬製特級リン酸二水素カリウムとリン酸水素二ナトリウムを蒸留水に溶解して混合したもの (0.1 M, pH 7.5) を用いた。

2.3 *n*-アルキルアミン類のオンライン SAS Schiff 塩基誘導体化における標準操作

溶離液には 50% (v/v) リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.5) と 50% (v/v) メタノールを含むものをを用い、イオン対試薬として 2 mM TEA⁺ Br⁻ を添加して用いた。ダブルプランジャーポンプを用いて2つのキャリアー流れとし、一方の流れにループインジェクターを用いて *n*-アルキルアミンのメタノール溶液の 100 µl を注入した。もう一方のキャリアー流れには SAS 水溶液 (8 mM) の 100 µl を試料溶液注入と同時に注入した。誘導体化反応が十分進行するように全流量を 0.5 ml min⁻¹ に設定して、Y 型ジョイントにより両液を混合し、70°C に設定された長さ 5 m の反応コイル中でオンライン誘導体化した。注入から 10 分経過以降、迅速な溶離のために総流量を 1.0 ml min⁻¹ として、250 nm で吸光検出した。

Fig. 3 Effect of $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ concentrations on retention factor of SAS-Schiff bases

Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) - methanol (5 : 5 v/v) + 0 ~ 16 mM $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$. Sample solution: 50 μM of each *n*-alkylamine SAS Schiff base. Chromatographic conditions: flow rate, 0.7 ml min^{-1} ; injection volume 20 μl ; detection wavelength, 250 nm. $\square$, SAS; $\diamond$, *n*-amylamine; $\circ$, *n*-hexylamine; $\triangle$, *n*-heptylamine; $\blacksquare$, *n*-octylamine

2.4 *n*-アルキルアミン類のオンライン SPAHNA Schiff 塩基誘導体化による標準操作

溶離液には 30% (v/v) リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.5) と 70% (v/v) メタノールを含むものを用い, イオン対試薬として 2 mM $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ を添加して用いた. 前項と同じく 2 つのキャリアー流れに *n*-アルキルアミンのメタノール溶液 (20 μl) と SPAHNA 水溶液 (15 mM, 100 μl) を同時に注入した. 反応コイル長, 反応条件, 流量など, 検出波長を 420 nm とした以外は前項と同じ条件とした.

3 結果と考察

3.1 *n*-アルキルアミン類のプレカラム誘導体化と HPLC 分離特性

オンライン誘導体化-RP-HPLC の検討に先立ち, プレカラム誘導体化した水溶性 Schiff 塩基のカラム分離特性について検討した. Driouch らの報告^{13)~15)}で, 40% (v/v) 以上のエタノールを含む水溶液では, SAS により誘導体化された *n*-アルキルアミン-Schiff 塩基は pH 7.0 ~ 8.6 の範囲で安定であることを見いだした. そこで, 50% (v/v) メタノールを含む水溶液中で, 4 種類の *n*-アルキルアミン (それぞれ 50 μM) に誘導体化試薬 (SAS あるいは SPAHNA, 2 mM) を添加して 40°C で 20 分間, 誘導体化反応を行った. 反応生成物を 50% (v/v) リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.5) - 50% (v/v) メタノールを溶離液とする一流路の RP-HPLC で分離検出した.

SAS を誘導体化試薬として用いた場合, 上記の条件では長い溶離時間を必要とし, 得られたシグナルもブロードで

Fig. 4 Typical chromatogram for pre-column derivatized SAS-Schiff bases

Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) - methanol (5 : 5 v/v) + 2 mM $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$. Sample solution: 50 μM of each *n*-alkylamine SAS-Schiff base. Chromatographic conditions: flow rate, 0.7 ml min^{-1} ; injection volume 20 μl ; detection wavelength, 250 nm

あり, アルキル鎖の長いものほど顕著であった. そこで, 溶離時間の短縮とシグナル形状の改善を目的として $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ を 1 ~ 16 mM の範囲で溶離液に添加して検討した (Fig. 3). $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ 濃度の増加に伴い溶離時間を短縮でき, シグナル形状も改善されたが, 高濃度の $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ では短いアルキル鎖長の Schiff 塩基で SAS との分離が悪くなるために, $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ 濃度として 2 mM を設定した. クロマトグラムの例を Fig. 4 に示す.

SPAHNA を誘導体化試薬として用いた場合の HPLC 分離も, 上記の条件で検討した. SPAHNA は疎水性が高く ODS カラムに強く保持されたため, 溶離液のメタノール分率は 70% (v/v) とした. $\text{TEA}^+ \text{Br}^-$ 濃度の 2 mM で 4 種類の *n*-アルキルアミン-Schiff 塩基のベースライン分離と 14 分以内での迅速な溶離が可能となった.

3.2 SAS を用いた *n*-アルキルアミン類の水溶性 Schiff 塩基へのオンライン誘導体化と HPLC 分離

Fig. 1 の HPLC システムを用いる *n*-アルキルアミン類のオンライン誘導体化について, 2 m の反応コイルと 40°C の温度条件で検討した. なお, 試料溶液, 試薬溶液の注入ループから Y 型ミキシングジョイントまでのチューブの長さは, ゾーンの広がりを抑えるためできるだけ短くした. 0.1 mM の *n*-アミルアミン (AmA) を含む試料溶液 (100 μl) と 0.5 mM の SAS を含む試薬溶液 (100 μl) を同時に注入したところ, AmA-Schiff 塩基に対応する小さなシグナルが得られた. SAS 濃度の増加, 注入体積の増加ではシグナル高さは改善はされず, 他のアルキルアミンでも同様の結果であった.

反応コイル長を 5 m, 反応温度を 70°C とし, SAS 濃

Fig. 5 Effect of concentrations of labeling reagent on the yield of on-line derivatization reaction

Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) - methanol (5 : 5 v/v) + 2 mM TEA⁺ Br⁻. Sample solution: 10 μ M *n*-alkylamines. Reaction coil: 5 m, 70°C. Total flow rate: 0.5 ml min⁻¹ (0 ~ 10 min), 1.0 ml min⁻¹ (10 ~ 30 min). Labeling reagent: (a), SAS; (b), SPAHNA. Injection volume: sample, 100 μ l (for SAS) or 20 μ l (for SPAHNA); reagent, 100 μ l. Detection wavelength: 250 nm (for SAS) or 420 nm (for SPAHNA). $\diamond$, *n*-amylamine; $\blacksquare$, *n*-hexylamine; $\triangle$, *n*-heptylamine; $\bullet$, *n*-octylamine

度 0 ~ 20 mM の範囲で誘導体化について再検討したところ、効率的に誘導体化できることが分かった。Fig. 5(a) に示すように、4 種類の 10 μ M *n*-アルキルアミンに対して十分な感度が得られ、SAS 濃度 8 mM 以上で最大感度が得られた。高濃度の SAS は AmA- Schiff 塩基とシグナルが重なるので、反応コイル中での反応時間について、流量を変化させて検討した。

分析対象物質であるアルキルアミンと SAS が反応コイル中で十分混合するように、最初の総流量を 0.5 ml min⁻¹ として 10 分間流し、その後、迅速に溶離できるように総流量を 1.0 ml min⁻¹ とした。4 種類の *n*-アルキルアミンのクロマトグラムの例を Fig. 6 に示す。

3.3 SPAHNA を用いた *n*-アルキルアミン類の水溶性 Schiff 塩基へのオンライン誘導体化と HPLC 分離

SPAHNA を用いるオンライン誘導体化についても同様に検討した。溶離液中のメタノール分率を 70% (v/v) として 10 mM リン酸緩衝液を用い、0 ~ 50 mM の SPAHNA 濃度で検討した。10 μ M の *n*-アルキルアミンを 100 μ l 注入した場合、上記濃度範囲で定量的な反応を得ることができなかった。このことから、SPAHNA が SAS よりも反応速度が遅いことで説明できる。反応率を高めるために、試料溶液の注入体積を 20 μ l とした場合、Fig. 5(b) に示すとおり SPAHNA 濃度 15 mM 以上で最大感度が得られた。クロマトグラムの例を Fig. 7 に示す。

Fig. 6 Typical chromatogram for *n*-alkylamines as SAS-Schiff bases by on-line derivatization

Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) - methanol (5 : 5 v/v) + 2 mM TEA⁺ Br⁻. Sample solution: 10 μ M of each *n*-alkylamine. Reagent solution: 8 mM SAS. Reaction coil: 5 m, 70°C. Total flow rate: 0.5 ml min⁻¹ (0 ~ 10 min), 1.0 ml min⁻¹ (10 ~ 30 min). Injection volume: sample, 100 μ l; reagent, 100 μ l. Detection wavelength: 250 nm

3.4 オンライン誘導体化 RP-HPLC による分析性能

2 種類の誘導体化試薬を用い、*n*-アルキルアミン濃度 5 ~ 50 μ M の範囲で検量線を作成したところ、相関係数 0.991 以上の良好な直線性が得られた (Table 1)。また、Table 1 に示すように、ピーク高さ、ピーク面積、リテンションファクターの再現性は SAS を用いた場合 1.16 ~ 3.78%、SPAHNA を用いた場合は 0.47 ~ 2.15% と良好な結果が得られた。*n*-アルキルアミンに対する検出限界は、

Table 1 Calibration data, reproducibility, and limits of detection by the on-line derivatization methods

Labeling reagent	Amine	Corr. coeff. ^{a)}	RSD, % ^{b)}			LOD/ $\mu\text{M}^{c)}$
			Area	Height	<i>k</i>	
SAS	AmA	0.998	2.00	3.78	2.94	0.5
	HxA	0.995	1.94	2.26	2.31	0.5
	HpA	0.996	1.97	2.11	1.96	0.7
	OcA	0.991	1.86	2.58	1.16	1.0
SPAHNA	AmA	0.999	1.76	0.47	1.79	0.08
	HxA	0.998	1.42	0.49	2.15	0.12
	HpA	0.999	1.35	1.55	1.57	0.12
	OcA	0.999	1.79	1.75	0.98	0.20

a) Concentration range: 5 ~ 50 μM ; b) Values analyzed with 8 measurements; c) Values at $S/N = 3$

Fig. 7 Typical chromatogram for *n*-alkylamines as SPAHNA-Schiff bases by on-line derivatization

Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) - methanol (3 : 7 v/v) + 2 mM TEA⁺ Br⁻. Sample solution: 5 μM of each *n*-alkylamine. Reagent solution: 15 mM SPAHNA. Reaction coil: 5 m, 70°C. Total flow rate: 0.5 ml min⁻¹ (0 ~ 10 min), 1.0 ml min⁻¹ (10 ~ 30 min). Injection volume: sample, 20 μl ; reagent, 100 μl . Detection wavelength: 420 nm

どちらの試薬ともキャピラリー電気泳動法により得られた結果¹³⁾¹⁶⁾よりも低い検出限界であった。SAS と SPAHNA を比較すると、SPAHNA は短い分析時間と高感度、高再現性が得られる点で優れた試薬である。

4 結 語

2 種類の水溶性誘導体化試薬を用い、*n*-アルキルアミンの水溶性 Schiff 塩基へのオンライン誘導体化をマーキングゾーン法により行った。誘導体化反応とカラム分離/検出を含む分析時間は SAS, SPAHNA についてそれぞれ 25 分、18 分であり、検出感度も SAS では 0.5 ~ 1.0 μM , SPAH-

NA では 0.08 ~ 0.20 μM が得られた。ワイン中のアルキルアミン濃度として mg l⁻¹ レベル (10 μM レベル) が報告されており¹⁷⁾, 実際の分析法として十分な感度を有していることが示された。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (一般研究 (B) No. 13440220) により行われた。

文 献

- 1) P. Simon, C. Lemacon: *Anal. Chem.*, **59**, 480 (1987).
- 2) A. Sevilano-Cabeza, Y. Moliner-Martinez, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó: *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 918 (2003).
- 3) J. Krol, P. G. Alden, J. Morawski, P. E. Jackson: *J. Chromatogr.*, **626**, 165 (1992).
- 4) M. Maruyama, T. Nagayoshi: *J. Chromatogr.*, **594**, 159 (1992).
- 5) J. Ruzicka, E. H. Hansen: "Flow Injection Analysis", (1998), (The Library of Congress, USA).
- 6) J. Ruzicka: *Anal. Chim. Acta*, **190**, 155 (1986).
- 7) Y. Saito, M. Kawazoe, K. Jinno: *Analyst*, **125**, 807 (2000).
- 8) D. F. Evans, P. H. Misse: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**, 1451.
- 9) D. F. Evans, P. H. Misse: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1987**, 1279.
- 10) M. Botsivali, D. F. Evans, P. H. Misse, M. W. Upton: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1985**, 1147.
- 11) K. J. Berry, F. Moya, K. S. Murray, A. M. B. Van Den Bergen, B. O. West: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1982**, 109.
- 12) S. R. Sandler, W. Karo: "Organic Functional Group Preparation", (1986), (Academic Press, New York).
- 13) R. Driouch, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu: *J. Chromatogr. A*, **934**, 95 (2001).
- 14) R. Driouch, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu: *Anal. Sci.*, **17**, a343 (2001).
- 15) R. Driouch, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1523 (2003).
- 16) R. Driouch, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu: *Electrophoresis*, in Press.
- 17) K. K. Ngim, S. E. Ebeler, M. E. Lew, D. G. Crosby, J. W. Wong: *J. Agr. Food Chem.*, **48**, 3311 (2000).

要 旨

n-アルキルアミン類の分離定量法として、陰イオン性アルデヒドを誘導体化試薬として用いる吸光検出-逆相分配高速液体クロマトグラフィーを検討した。誘導体化試薬としては、サリチルアルデヒド-5-スルホン酸イオン (SAS) と 4-(4-スルホフェニルアゾ)-1-ヒドロキシ-2-ナフトアルデヒド (SPAHNA) を用いた。*n*-アルキルアミンを含む試料溶液と試薬溶液はそれぞれの流路に同時に注入され、マーキングゾーン法によりオンラインで混合され、5 m, 70℃ の反応コイル中で水溶性シッフ塩基へと誘導体化された。生成した水溶性シッフ塩基は逆相カラムにより分離され、吸光検出された。オンライン誘導体化とカラム分離/検出を含む分析時間は、SAS を用いた場合 25 分、SPAHNA を用いた場合は 18 分であった。アルキルアミン類に対する検量線は 0～50 μM の範囲で良好な直線性が得られ、検出限界は、SAS を用いた場合 0.5～1.0 μM, SPAHNA を用いた場合は 0.08～0.20 μM であった。