薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (4) 460-465 (1980)

Mesitylenesulfonyl 化によるナフチルアミンの高速液体クロマトグラフィー¹⁾

岡本光美, 山田不二造
岐阜県衛生研究所²⁾

Determination of Naphthylamines as Their Mesitylenesulfonyl Derivatives by High Speed Liquid Chromatography¹⁾

MITSUYOSHI OKAMOTO and FUJIZO YAMADA

Gifu Prefectural Institute of Public Health²⁾

(Received September 19, 1979)

The trace amount of β -naphthylamine (β -NA) co-existing with a large amount of α -naphthylamine (α -NA) was determined with high accuracy and sensitivity by high speed liquid chromatography after mesitylenesulfonylation (Ms-). By elution with methanol/acetonitrile/pH 4.6, 0.1 M sodium acetate buffer (54: 6: 40 v/v) on an ODS column, the resolution between Ms- α -NA and Ms- β -NA peaks was 3.43. A more accurate detection of Ms- β -NA than of Ms- α -NA was possible at approximately 240 nm using an ultraviolet monitor. With this method, the amount of Ms- β -NA was determined within 1.1% error over the range from 0.005 to 10 μ g, and the limit of detection was 0.005 μ g.

Keywords— α -naphthylamine; β -naphthylamine; mesitylenesulfonylation; high speed liquid chromatography; aromatic amine; carcinogens

ま え が き

α -ナフチルアミン (α -NA) 中には、膀胱癌を引き起こすといわれている β -ナフチルアミン (β -NA) が不純物として含有されている。³⁾ OSHA (occupational safety and health administration) では α -NA 中の β -NA の含量を 1% 以下と規定している。⁴⁾ α -NA 中の β -NA 量の把握, および分析法を確立することは, 健康保護のためにも重要な意義を持っている。われわれは先に NA のアミノ基を pH 7.5 水溶液中で *p*-toluenesulfonyl chloride と反応させ, tosyl (Ts-) 誘導体とし, 染料中に残留する α - および β -NA を高速液体クロマトグラフィー (HSLC) により同時分析する方法を報告した。⁵⁾ α -NA 中の β -NA の HSLC については, 他に, そのままで HS LC を行なう報告がある。⁶⁾ しかしこれらの条件では, 両ピークの分離度 (R_s) が不充分であったり, ピークのテーリングが大きいなど, 大量の α -NA 中に不純物として存在する微量の β -NA の定量には不適当であった。この点を改善するため, HSLC の分離条件の検討とあわせて, 反応試薬や検出波長の選択など, α -NA に対する β -NA の相対強度を増大させる条件を設定することにより, β -NA の定量精度の改善をはかった。その結果, 分離条件として逆相系を選び, 反応試薬として mesitylenesulfonyl chloride (Ms-Cl) による mesitylenesulfonyl (Ms-)

1) 日本薬学会第 99 年会で発表, 札幌, 1979 年 8 月。

2) Location: Noishiki 4-chome, Gifu 500, Japan.

3) G.M. Bonser, D.B. Clayson, J.W. Jull, L.N. Pyrah, *Br. J. Cancer*, **6**, 412 (1952); G.M. Bonser, *J. Pathol. Bacteriol.*, **55**, 1 (1943); R.A.M. Case, M.E. Hosker, D.B. McDonald, J.T. Pearson, *Brit. J. Industr. Med.*, **11**, 75 (1954); S. Johansson, L. Angervall, U. Bengtsson, L. Wahlqvist, *Cancer*, **33** (3), 743 (1974); G.M. Bonser, D.B. Clayson, J.W. Jull, *Brit. Med. Bull.*, **14**, 146 (1958); M.W. Goldblatt, *ibid.*, **14**, 136 (1958); A.L. Walpole, M.H.C. Williams, *ibid.*, **14**, 141 (1958); D.B. Clayson, E.H. Cooper, *Adv. Cancer Res.*, **13**, 271 (1958).

4) J.H. Stender, *Fed. Regist.*, **39**, 3756 (1974); *Chem. Eng. News*, **52 Feb 11**, 12 (1974).

5) 岡本光美, 山田不二造, 中村晃忠, 衛生化学, **25**, 48 (1979).

6) I. Mefford, R.W. Keller, R.N. Adams, L.A. Sternson, M.S. Yllo, *Anal. Chem.*, **49** (4), 683 (1977); M. Popl, V. Dolansky, J. Fahrnich, *J. Chromatogr.*, **148**, 195 (1978); 松下秀鶴, 労働衛生研究所年報, 1975, p. 43.

化を行なうことによって満足すべき結果が得られた。なお、Ms-Cl を用いる芳香族アミンの HSLC は本法が最初であるので Ms-Cl と芳香族アミンとの反応条件についても検討を加えた。

実 験 方 法

1. 試薬および試液 特に述べるもの以外はすべて試薬特級を用いた。リン酸塩緩衝液: 0.2 M Na_2HPO_4 溶液 16.0 ml と 0.2 M NaH_2PO_4 溶液 84.0 ml を混合して pH 7.5 に調整した。Ms-Cl 溶液: Ms-Cl 0.5 g にアセトンを加えて溶かし全量 100 ml とした (5 mg/ml)。 β -NA 標品: β -NA (純度 99.87%) を薄層クロマトグラフィー (TLC, Kieselgel G type 60 (Merck), 展開溶媒: *n*-ヘキサン/酢酸エチル/氷酢酸, 80:20:5 (v/v)) にて分離, 精製後, エチルエーテル, 蒸留水にて再結晶をくり返した (mp 111.0—113.0° (文献値⁸⁾ 110.1—110.2°)). β -NA 標準溶液: β -NA 標品 100 mg を精秤し, メタノールに溶して 100 ml とした (1 mg/ml)。必要に応じメタノールで希釈して用いた。内部標準溶液: アニリン 2 ml を定量法により, あらかじめ Ms-化したメタノールを加えて 10^5 ml とした (2×10^{-5} ml/ml)。 α -NA 試料: Table III に示したように手持ちおよび新たに入手した 10 種を用いた。Ms- β -NA: β -NA 標品を定量法操作により Ms-化した後 TLC (Kieselgel G type 60 (Merck), 展開溶媒: メタノール/酢酸エチル/水, 48:12:40% (v/v)) で分離し, Ms- β -NA 相当部分をかきとり, メタノールで抽出, 濃縮後, 水にて再結晶した。このものについて HSLC のピークが単一であることから純品とみなし標準物として用いた (mp 177—179°. Anal. Calcd $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$: C, 70.13%; H, 5.88%; N, 4.30%. Found: C, 70.18%; H, 5.96%; N, 4.14%). Ms- α -NA: α -NA (Table III No. 10) を Ms- β -NA と同様操作し再結晶後, 再び TLC (Kieselgel G type 60 (Merck), 展開溶媒: ベンゼン/酢酸エチル/氷酢酸, 65:20:15% (v/v)) で分離し, Ms- α -NA 相当部分をかきとり, 以下メタノール抽出, 水より再結晶を経て標準物を作成した (mp 160—162.5°. Anal. Calcd $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$: C, 70.13%; H, 5.88%; N, 4.30%. Found: C, 69.95%; H, 5.92%; N, 4.09%).

2. 装置および器具 波長可変 UV モニター付, 日立 635 T 形高速液体クロマトグラフ, 協和精密超高压マイクロポンプ KHW-8 型, 協和精密波長可変検出器 KLC-2235 型, 日本電子 2 重収束型質量分析計 JMS OISG-2 型, パーキンエルマー 240 型 CHN コーダー, 大洋科学 M-100 L 型恒温振盪機, ハミルトン製マイクロシリンジを使用して行なった。

3. 液体クロマトグラフィー条件 カラム: JASCOSIL SC-01 (日本分光) 約 2 g を内径 4 mm × 長さ 150 mm のステンレス製カラムに Blance Density 法によって充填した。溶離液: メタノール/アセトニトリル/pH 4.6, 0.1 M 酢酸緩衝液 (54:6:40% (v/v))。流速: 0.8 ml/min。圧力: 100 kg/cm²。測定吸収波長: 240 nm。温度: 室温。

4. 定量法 β -NA 標準溶液 (0.001—1 mg 相当) をとり, メタノールを留去後, 残渣にリン酸塩緩衝液 1 ml および Ms-Cl 溶液 2 ml を加え, $20 \pm 0.5^\circ$ の水浴中で振りまぜながら 60 分間反応後, 直ちに, 内部標準溶液 1 ml を加えたのち分液ロートに移し, 1 N 水酸化ナトリウム試液および水 10 ml を加え 5 分間振りまぜる。つぎに *n*-ヘキサン 5 ml を加え 10 分間振りまぜ水層を洗う。この操作を 4 回繰り返す。さらに 1 N 塩酸 15 ml, 四塩化炭素 5 ml を加え 10 分間振りまぜる。この操作を 3 回繰り返して, 全四塩化炭素層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムを用いて脱水する。これをロータリーエバポレーターを用いて注意深く四塩化炭素を留去する。残留物にメタノール 1 ml を加えて溶し, マイクロシリンジを使用して高压サンプリングバルブに注入する。NA の定量は内部標準とのピーク面積比法により行なう。

結果および考察

1. 高速液体クロマトグラフィー

1. 1 Ms-NA の吸収スペクトル Ms- α -NA, Ms- β -NA の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。この図に示されるように 230 nm における後者の吸光度が大きいにもかかわらず 240 nm を測定波長に選んだ理由は, 短波長側で測定感度を上げた場合, ベースノイズの発生が見られたことと, 大量の α -NA 中に存在する微量 β -NA を測定するためには, β -NA の測定に対する α -NA による妨害を出来る限り小さくすることであり, α -NA に対して相対的な吸収強度の大きい 240 nm を検出波長とするほうが妥当と判断されたからである。

1. 2 充填剤の検討 Ms-NA のクロマト挙動をイオン交換樹脂, ポリスチレン系充填剤, シリカゲル系充填剤について検討した。その結果, シリカゲル-ODS 系充填剤が良好な分離を与えたので, 以下 ODS 系充填剤 6 種を検討した。内径 4 mm × 長さ 150 mm のカラムを使用した場合, 液体クロマトグラフィー条件で Ms- α -NA, Ms- β -NA の R_s は JASCOSIL SC-01 (日本分光) で 3.43, LiChrosorb RP-18 および RP-8 (Merck) では 1.70, HITACHI GEL 3050 (日立) で 0.99, WAKO GEL ODS (和光純薬) で 1.19, PERMAPHASE ODS (Dupont) で 0.00 であった。したがって, 以後の実験には JASCOSIL SC-01 カラムを使用して, メタノール/水, アセトニトリル/水, メ

7) 後藤俊夫, 柿沢 寛, 湊 宏, “フィーザー最新有機化学 I,” 丸善, 東京, 1966, pp. 353—358.

8) 日本化学会, “化学便覧基礎編 I,” 改訂 2 版, 丸善, 東京, 1975, p. 251.

Fig. 1. Absorption Spectra of Mesityl-enesulfonylated Naphthylamines in Methanol

-----: Ms- α -naphthylamine (1.0 μ g/ml),
 —: Ms- β -naphthylamine (1.0 μ g/ml).

タノール/酢酸緩衝液, アセトニトリル/酢酸緩衝液, メタノール/アセトニトリル/酢酸緩衝液, メタノール/酢酸エチル/水の各混合液で検討した。その結果, メタノール/アセトニトリル/pH 4.6, 0.1 M 酢酸緩衝液 (54: 6: 40% (v/v)) とした場合, Ms- α -NA, Ms- β -NA の良好な分離が得られ, (Fig. 2, $R_s=3.43$), 以下この条件で測定した。

1. 3 内部標準物質の選択 他の各種芳香族アミンの β -NA に対する相対保持時間を Table I に示す。これらの結果より今回はアニリンを保持時間および安定性の点から採用した。なお Ms-アニリンは冷暗所で少くとも 20 日間は安定であった。

Fig. 2. Liquid Chromatogram of a Standard Mixture of Naphthylamines with Aniline (*i.s.*) as Their Ms-derivatives

Operating conditions; packing: JASCOSIL SC-01 (Nihonbunko), column: 4 mmID $\times$ 150 mm, mobile phase: methanol/acetonitrile/pH 4.6, 0.1 M sodium acetate buffer (54: 6: 40% (v/v)), column temp.: room temp., flow-rate: 0.8 ml/min (100 kg/cm²), detection: 240 nm.

Peaks; a: Ms-aniline (4×10^{-4} μ l),
 b: Ms- α -naphthylamine (5.375 μ g),
 c: Ms- β -naphthylamine (5.125 μ g).

TABLE I. Relative Retention Data of Some Ms-Aromatic Amines

Parent compounds	Relative retention times	Parent compounds	Relative retention times
Benzylamine	0.58	<i>p</i> -Phenetidine	0.61
Benzidine	1.09	<i>p</i> -Anisidine	0.47
<i>o</i> -Toluidine	0.80	2-Aminoanthraquinone	0.50
<i>p</i> -Toluidine	0.68	Sulfanilamide	0.40
<i>p</i> -Chloroaniline	0.96	<i>p</i> -Aminoacetophenone	0.44
2,4-Dinitroaniline	0.32	2,4-Dinitrophenylhydrazine	0.71
<i>m</i> -Nitroaniline	0.66	<i>m</i> -Aminophenol	0.35
2,5-Dichloroaniline	0.65	<i>p</i> -Aminoazotoluene	1.63
<i>p</i> -Aminobenzenesulfonamide	0.00	<i>o</i> -Aminodiphenyl	1.37
<i>p</i> -Nitroaniline	0.00	α -Naphthylamine	0.74
Aniline	0.42	β -Naphthylamine	1.00

Liquid chromatographic condition was shown in Fig. 2.

Fig. 3. Effect of pH on Mesitylenesulfonylation of Naphthylamines

△---△: Ms- α -naphthylamine,
○—○: Ms- β -naphthylamine.

Fig. 4. Effect of Reaction Time and Reaction Temperature on Mesitylenesulfonylation

△: 0°, ▲: 10°, ○: 20°, ●: 30°, □: 40°.
-----: remaining- α -naphthylamine,
—: remaining- β -naphthylamine.
10 mg of mesitylenesulfonyl chloride and 1 mg of α -or β -naphthylamine were used.

Fig. 5. Effect of the Reagent Amount on Mesitylenesulfonylation of Naphthylamines in Mixture

△; α -naphthylamine: β -naphthylamine=1 mg: 0.01 mg.
○; α -naphthylamine: β -naphthylamine=1 mg: 0.001 mg.
-----: remaining α -naphthylamine,
—: remaining β -naphthylamine.

TABLE II. Comparative Data on β -Naphthylamine Measured by Ms-Method and Ts-Method⁵⁾

	Taken (μ g)	α -Naphthylamine added (μ g)	β -Naphthylamine found (μ g)	Recovery (%)	c.v. (%)
Ms-Method ($n=10$)	1.03	1041	1.00—1.05	97.1—101.9	1.60
	10.3	1041	10.0—10.7	97.1—103.9	1.83
Ts-Method ($n=10$)	1.01	1032	0.98—1.06	97.0—104.9	2.89
	10.6	1032	10.2—10.7	96.2—100.9	2.04

TABLE III. Amount of β -Naphthylamine Co-existing in α -Naphthylamine measured by Ms-Method

Sample No.	α -Naphthylamine, taken (mg)	β -Naphthylamine, added (μ g)	β -Naphthylamine, found (%)
1	1.15	10.3	0.56
2	1.31	51.5	5.65
3	1.56	10.3	0.41
4	1.21	20.5	2.48
5	0.92	10.3	Trace
6	1.01	10.3	Trace
7	1.20	10.3	1.41
8	0.99	51.5	6.22
9	1.06	10.3	0.83
10	1.08	10.3	0.47

Fig. 6. Liquid Chromatogram of a Mixture of Naphthylamines (α -NA: β -NA=1: 0.001 mg)

Peaks a: Ms-aniline (internal standard),
b: Ms- α -naphthylamine,
c: Ms- β -naphthylamine.

Liquid chromatographic condition was shown in Fig. 2.

1. 4 検量線, 検出限界および精度 β -NA の検量線を, 定量法条件下で作成した. その結果, 注入量 0.005—10 μ g の範囲で原点を通る直線が得られた. 相関係数は 0.9994 ($n=8$), 検出限界は 0.005 μ g であった. Fig. 2 は Ms- α -NA, Ms- β -NA と内部標準として使用した Ms-アニリンのクロマトグラムである. また β -NA の 5.125 μ g を用いた繰り返し実験における変動係数は 1.1% ($n=6$) であった.

2. Ms-化反応条件の検討

2. 1 pH の影響 Ms- β -NA の生成を, β -NA 1 mg 秤取り緩衝液により pH 1.0—12.0 の間で変化させ定量法にしたがって測定した結果を, Fig. 3 に示す. その結果, pH が 7.0—8.0 の範囲でピーク高さは最大となった. したがって Ms-化は pH を 7.5 で行なった. また Ms- α -NA の生成を NA 1 mg 秤取り検討したところ, β -NA と同様の結果を得た.

2. 2 Ms-化反応温度および反応時間の検討 Ms- β -NA の反応に要する最低温度および最小時間について, 反応温度 0—40°, 反応時間 5—60 min とし, α -NA および β -NA 各 1 mg をとり, 約 6.5 倍濃度の Ms-Cl と反応させ, 未反応の NA を前報⁵⁾ の Ts-化を利用して HSLC で測定し検討した. その結果, Fig. 4 に示すように 20°, 50 min 以上で β -NA は反応が終了した. よって以後の実験では反応温度, 反応時間を 20°, 60 min にすることとした. この条件での α -NA の反応率は約 70% であった.

2. 3 反応に要する Ms-Cl 量の検討 大量の α -NA 対微量の β -NA の存在比として, 1 mg: 0.01 mg および 1 mg: 0.001 mg の混合試料を作成し, β -NA を完全に反応させるのに要する Ms-Cl 量について, 反応温度 20°, 反応時間 60 min の条件で検討した. その結

果, Ms-Cl は前者の場合 7.5 mg, 後者の場合 6 mg を使用すれば反応は終了した. よって以後の実験では Ms-Cl を 10 mg (約 6.5 倍量) 作用させることとした. この時, 未反応の α -NA は約 30% 存在した. また α -NA の反応完了には Ms-Cl 約 60 mg を必要とした (Fig. 5).

3. 大量の α -NA 中における β -NA 添加回収実験

α -NA 1 mg に対し, β -NA 0.01 mg および 0.001 mg 添加した後, 本報の定量法および前報⁵⁾ の Ts-化法にしたがって定量した結果を Table II に示した. Ts-化法に対する Ms-化法の利点は精度が上ったことであり, その

Fig. 7. Mass Spectra of Ms-β-Naphthylamine and Peak c in Fig. 6

理由はクロマトグラムの分離がよいことに原因するものと思われた。

4. α-NA 中の β-NA の分析

本法により、新たに入手した α-NA (No. 1, 10) および手持の α-NA (No. 2—9) 中の β-NA 含量を標準添加法により測定した結果、手持の古い α-NA にはかなり高濃度の β-NA が検出された (Table III). β-NA の同定については、β-NA 相当フラクションを分取後、質量分析した結果、Ms-β-NA 標準品 ($C_{19}H_{19}NO_2S$: Calcd 325.42) と完全に一致した (Fig. 6, Fig. 7).

ま と め

HSLC を用いて大量の α-NA 中の微量 β-NA の分離、分析を検討した結果、Ms-体では Ts-体よりもすぐれた分離が可能となった。この検出限界は前報の Ts-化法⁵⁾ の約 2 倍程度の感度を得られた。さらに Fig. 2 の如く反応条件 20°, 60 min で β-NA は α-NA の約 3 倍のピーク高を示すので大量の α-NA 中に存在する微量の β-NA を精度、感度とも良好に検出することができた。また Table I の結果から本法は芳香族アミン、染料中間体の分析にも応用可能と考えられた。

謝辞 御指導、御助言を賜りました名古屋市立大学薬学部教授 岸本 博、岐阜薬科大学助教授 河合 聡、国立衛生試験所薬品部 中村晃忠、小島茂雄ならびに鹿庭正昭の諸先生方に深謝致します。