

臭化カリウム錠剤によるクロマトグラムバッファメモリ化の検討*

神野清勝[®]， 藤本忠蔵， 出利葉正義**， 故 武内次夫， 石井大道***

(1979 年 11 月 8 日受理)

マイクロ高速液体クロマトグラフィーの特長を生かした臭化カリウム錠剤をバッファメモリ的に使用する赤外吸収スペクトル法との結合について検討した。

その結果，臭化カリウム錠剤は，保存可能な試料については必要に応じていつでも測定したクロマトグラムを容易に再現できるバッファメモリとして非常に有用であることが明らかになった。この結果を基にして，液体クロマトグラフからの溶出液を自動的に捕集できる装置を試作し，10 μg 以下のピレンのクロマトグラムを容易に得ることができた。

又，フーリエ変換赤外分光計を用いることにより，普通の赤外分光計の感度より一けた以上の感度向上が期待できることも確認した。

1 緒 言

最近，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が，テフロンチューブカラムを用いることによってマイクロ化され，マイクロ高速液体クロマトグラフィー (MHPLC) と呼ばれて急速に普及しつつあるが^{1)~4)}，この方法は，カラムがマイクロ化されたために試料注入量や，移動相溶媒の量が (2~20) μl 程度少なくて済むために質量分析計との直結化^{5)~11)}や赤外分光光度計¹²⁾，紫外分光光度計などとの接続が容易にできる特色を有している。

本報告では，MHPLC の特長を生かして，臭化カリウム錠剤をバッファメモリ的****に使用する赤外吸収スペクトル法との結合について検討した結果を報告する。

2 実験材料及び装置

本報告で使用した装置は以下のものである。

* ミクロ高速液体クロマトグラフィーと赤外吸収スペクトルの結合に関する研究 (第1報)

** 豊橋技術科学大学物質工学系：愛知県豊橋市天伯町字雲雀ヶ丘 1-1

*** 名古屋大学工学部：愛知県名古屋市千種区不老町

**** 計算機用語であるが，ここでは次の意味に用いている。一度媒体にデータをなんらかの形でメモリし次の方法でその媒体からデータを読み出す。そのような媒体をバッファメモリと呼ぶ。

具体的には MHPLC からのデータを臭化カリウム錠剤上にメモリし，臭化カリウム錠剤から IR データを得るものである。又，クロマトグラムメモリは，クロマトグラムを臭化カリウム錠剤にメモリすることである。

ミクロ高速液体クロマトグラフ：日本分光製ファミリーック 100 N，ユビデック 100-11 紫外分光光度計並びに東電機製マイクロフィーダ MF-2 型

赤外測定装置：日本分光製赤外分光光度計 A-3 型，ビームコンデンサー BC-1 型，並びに DigiLab 製 FTS-10 型フーリエ変換赤外分光光度計，20 mm ϕ 並びに 10 mm ϕ 用錠剤製型器

使用した試薬はすべて市販特級品，カラム充てん剤は，日本分光製 SC-01 (ODS)，HP-01 (スチレンジビニルベンゼン) である。カラム並びに溶媒の輸送系としてはすべて内径 0.5 mm のテフロンチューブを使用した。カラム長さは 10 cm，流速は (4~32) $\mu\text{l}/\text{min}$ である。

3 結果と考察

3.1 捕集媒体の検討

捕集媒体として，臭化カリウム結晶 (3 mm $\times$ 3.5 mm)，その結晶を捕集後錠剤化したもの，10 mm ϕ の錠剤の3種類について検討した。その結果が Fig. 1 である。試料はピレンを用いた。Fig. 1 中の (a)，(b)，(c)，(d) はそれぞれ

(a) 結晶に直接マイクロシリッジで試料溶液を滴下

(b) MHPLC により分離されたピレンを結晶に直接捕集 (方法は後述と同様に紫外検出器のピークを観察しながら捕集した。)

(c) (b)の結晶を錠剤化

(d) 臭化カリウム錠剤に分離捕集

の場合に相当する赤外吸収スペクトルである。840 cm^{-1} ，740 cm^{-1} ，710 cm^{-1} がピレンの特性吸収に相当する。この結果は，結晶又は錠剤に捕集する方法が捕集後錠剤化するよりずっと有効であることを示している。

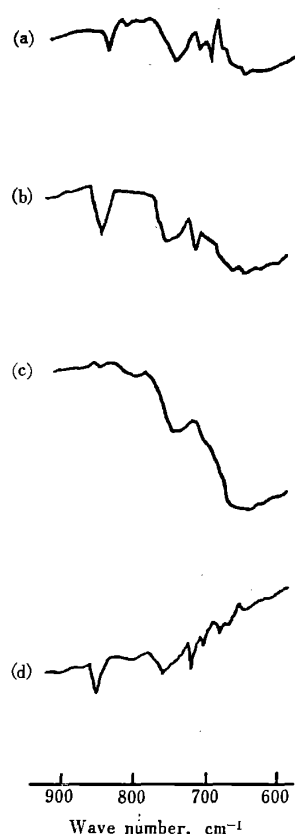


Fig. 1 Infrared spectra obtained by various collecting methods

(a) Pyrene 625 ppm KBr crystal; (b) Pyrene 800 ppm KBr crystal after MHPLC separation; (c) Pyrene 800 ppm KBr disk made by above crystal; (d) Pyrene 800 ppm KBr disk after MHPLC separation

そこで, 今回は錠剤による捕集を検討することにした。

3.2 単一成分の捕集

3.1 と同様ピレンを用いて単一成分の捕集について検討した。ピレン濃度を 100 ppm から 1000 ppm まで変化させて, その 8 μ l を SC-01 カラムで分離した後, 紫外検出器のクロマトグラムが立ち上がりはじめて 30 秒後から 10 mm ϕ 錠剤に捕集し赤外吸収スペクトルを測定した結果が Fig. 2 である。左が紫外吸収によるクロマトグラム, 右が赤外吸収スペクトルである。クロマトグラムはピレン濃度とほぼ比例して変化しているのに対して, 赤外吸収スペクトルでは, 300 ppm でわずかに特性吸収がみられるものの 100 ppm ではみられないことが分かる (300 ppm はピレン重量 2.4 μ g に相当する)。しかし, 特性吸収の強度はピレン濃度依存性がはっきり認められ, 錠剤による捕集はスペクトル的にはほぼ完全であることが分かる。

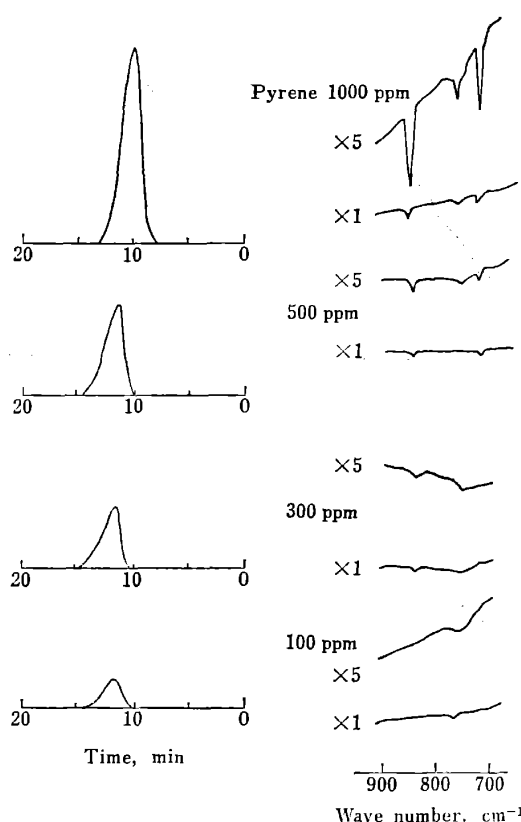


Fig. 2 UV chromatograms and IR absorption Spectra depended on the pyrene concentration

3.3 2成分の捕集

次に, カラムに HP-01 を用いて, フェナセチンとカフェインの2成分の分離捕集を行った。Fig. 3, Fig. 4 がその結果である。Fig. 3 は, クロマトグラムのA成分を紫外クロマトグラムの立ち上がりより 30 秒後から1枚の錠剤に捕集して得られた赤外吸収スペクトルであ

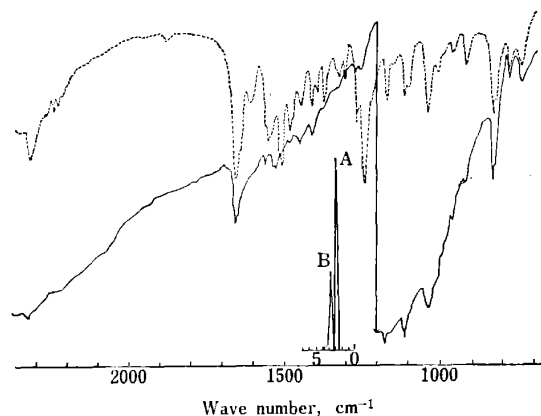


Fig. 3 Infrared spectrum of phenacetin separated by MHPLC

T (%) $\times$ 5; ---- Standard; — Sample

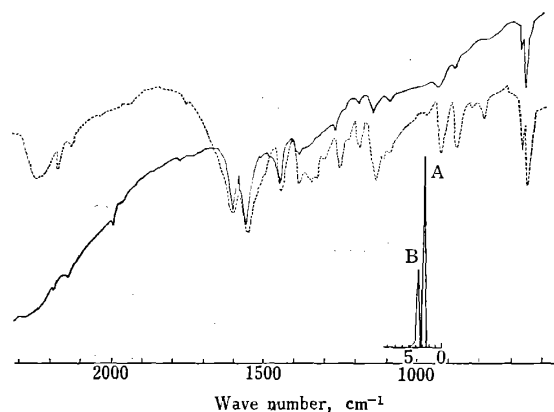


Fig. 4 Infrared spectrum of caffeine separated by MHPLC

T (%) $\times 5$; ---- Standard; — Sample

り、Fig. 4 は同様の操作で得られたB成分のスペクトルである。両者の試料量はともに $2\ \mu\text{l}$ (各成分の重量は $5\ \mu\text{g}$) であり、Aでは破線のフェナセチンとほぼ同一のスペクトル $\{(1600\sim 1700)\text{ cm}^{-1}$, $(1300\sim 1500)\text{ cm}^{-1}$, 1050 cm^{-1} , 840 cm^{-1} のピークが一致している} が得られており、A成分がフェナセチンであることが十分判読できる。又、Bについても破線のカフェインとほぼ同一のスペクトルが得られ、B成分がカフェインであると同定可能である。

以上の結果から、臭化カリウム錠剤による捕集が完全に可能であることが判明した。

3.4 移動相中の水の影響

HP-01 のようなカラムにおいてはメタノールのみで十分分離が可能であるが、SC-01 のような逆相カラムにおいては、メタノールに水を添加することで格段に分離を向上させることが知られている。しかし、臭化カリウム錠剤を用いるときには水の影響* がかなり大であると予想されるのでこれについて検討した。移動相中の水のメタノールに対する比を $0\sim 20\%$ の範囲で変化させて SC-01 カラムによりピレンを分離し、これを錠剤に捕集した後、赤外吸収スペクトルを測定した。結果を Fig. 5 に示した。赤外吸収スペクトルからみるかぎりでは水添加の影響は全くみられないが、ピレン以外の化合物で特性吸収が水の吸収と重なるものなどでは影響があるかもしれない。しかし、多環芳香族化合物では 1000

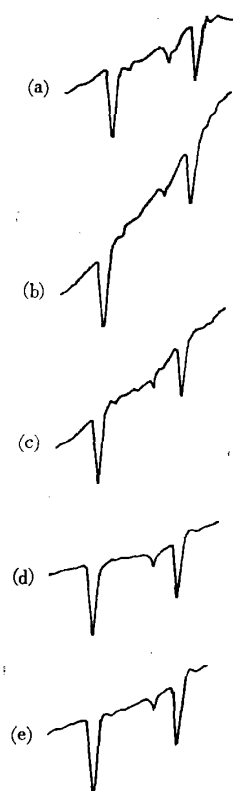


Fig. 5 Effect of water contents to the IR spectrum of 1000 ppm pyrene

(a) Methanol : 100 %; (b) Methanol : 98 %, water : 2 %; (c) Methanol : 95 %, water : 5 %; (d) Methanol : 90 %, water : 10 %; (e) Methanol : 80 %, water : 20 %

cm^{-1} 以下に特性吸収を有する化合物が非常に多いので本方法の大きな障害とはならない。一方錠剤についてみると、 20% 以上の水が含まれているとろく割れやすくなることが観察されているので、錠剤捕集法に利用できる移動相中の水含量は 20% が上限であろう。なお、このことはアセトニトリル-水系などの場合にも同様と考えられる。

次に錠剤をバッファメモリ的に使用するために、捕集後の放置時間が赤外吸収スペクトルに影響があるかどうかについても検討した。その結果を Fig. 6 に示した。捕集後 30 分で顕著であった 3400 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} (メタノール空試験でもこの2吸収が現れる) の吸収は、 24 時間後にはほとんど消失しているのに対して、 1000 cm^{-1} 以下のピレンの特性吸収の変化はみられないことから放置**したことによる影響はほとんどなく、臭化カリウム錠剤はピレンの場合にはかなり安定なクロマトグラムメモリとして利用できることが明らかとなった。

* ここでの水の影響とは、赤外吸収スペクトルそのものへの影響であり、スペクトルへの影響が小さければ赤外クロマトグラムにした場合にも小であると考えられる。

** 普通のデシケーター中での保管

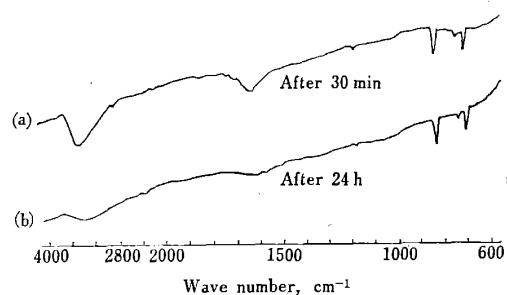


Fig. 6 Effect of lapse time

3.5 クロマトグラムバッファメモリの検討

3.1 から 3.4 により 錠剤捕集の有効性を示すことができたので, 当初の目的であったクロマトグラムのバッファメモリとしての利用の可能性について次に検討を行った。

臭化カリウム錠剤上に LC からの分離成分を手動で錠剤を移動させて連続的に捕集し, その錠剤の赤外吸収スペクトル測定により赤外吸収クロマトグラムを得た。Fig. 7 に示したように, 20 mmφ 錠剤上に 1 から 10 まで連続的に溶出液を捕集し, この各部分の赤外スペクトルを測定した結果が左側である。捕集位置の移動に伴い, すなわちクロマトグラムの変化に伴って, ピレン特性吸収の大きさが変化してゆくことが分かる。赤外スペクトルの 840 cm^{-1} の特性吸収を用いて得られたクロマトグラムが Fig. 8 である。実線が紫外吸収, 破線が赤外吸収によるクロマトグラムである。紫外クロマトグラムから 30 秒遅れて赤外クロマトグラムが始まっているが, これは紫外検出器から捕集位置までの距離約 10 cm から予測されるより遅れが大きく, 赤外の感度が低いためであると考えられる。赤外クロマトグラムでは, テーリングが大きくみられるが, これは 10 cm テフロンチ

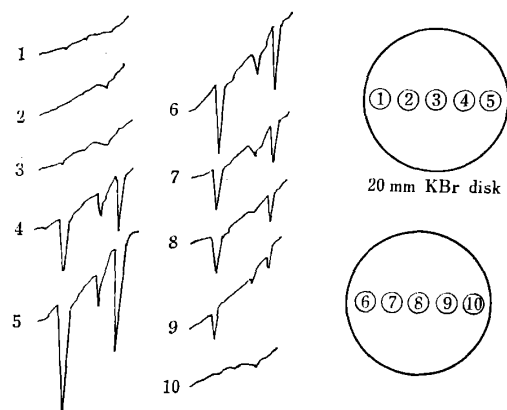


Fig. 7 Infrared spectra of pyrene separated by MHPLC depended on the concentration profile

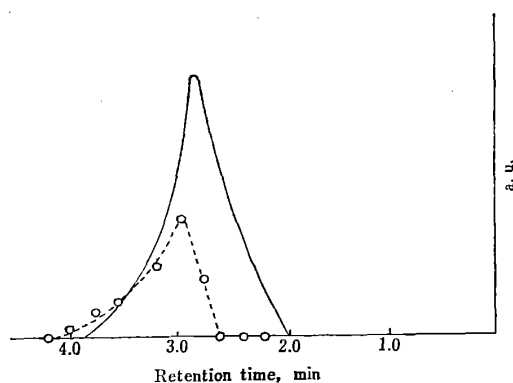


Fig. 8 Chromatograms of pyrene detected by UV and IR

— UV; ---- IR

ューブを移動してくる間に生じた広がりによるものとみられる。しかし, 接続管が内径 0.1 mm 以下になるとこの広がりほぼ無視できる。

この結果から, 臭化カリウム錠剤による MHPLC クロマトグラムのメモリ化は十分可能であることが明らかとなった。

3.6 自動捕集装置の試作

3.5 の検討によりバッファメモリとして使用可能であると判断できたので分離成分の自動捕集装置を試作した。Fig. 9 にその概略図を示した。市販のマイクロフィードと同様にギアを用いて移動速度を可変とし, 上部にプレートを置いてこのプレートを間接加熱し, その上に臭化カリウム錠剤をのせてプレートを移動させ, MHPLC からの溶出液が連続的に錠剤上に線を描くように捕集し帯状にクロマトグラムをメモリする。カラム出口から捕集位置までの距離並びに流速により広がり

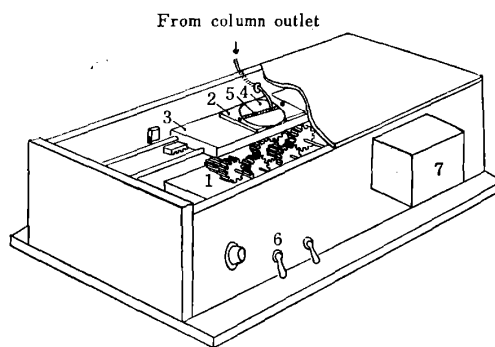


Fig. 9 Eluents collecting equipment

1: Radiating plate; 2: Disk holder; 3: Movable plate; 4: KBr disk memory; 5: Collected eluents; 6: On-off switch; 7: Synchronous motor

生ずるが、これについては現在詳細に検討中で別途報告の予定である。

カラム出口からの距離 13 cm, 流速 32 μ l/min の場合に得られたクロマトグラムを Fig. 10 に示した。実線が紫外吸収によるもの、破線が赤外吸収によるもので、遅れは紫外検出器から捕集位置まで 10 cm 程度あることによる。又、赤外クロマトグラムでみられるテーリングもこの距離による広がりである。これまでの検討では、ピレンに対して約 10 μ g まではこのような赤外クロマトグラムを得ることが可能である。

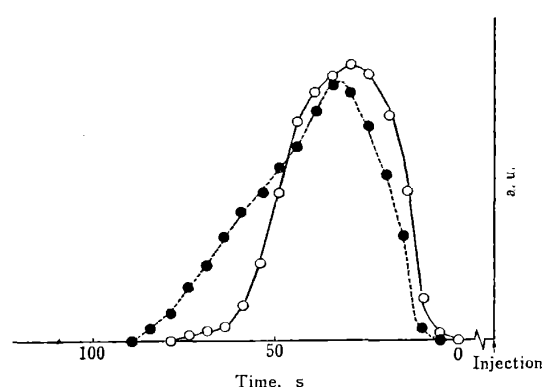


Fig. 10 Chromatograms of pyrene detected by UV and IR using newly designed collecting equipment
— UV; ---- IR

3.7 高感度化への方向; FT-IR の検討

普通の赤外分光光度計にビームコンデンサーを装着して測定した結果について述べてきたが、この方法の検出限界は数 μ g であり、これ以上の感度向上は困難とみられる。MHPLC の紫外検出器の感度は ng 以下のオーダーであり、赤外分光法とは大きな隔たりがある。しかし近年、急速に普及しつつあるフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を使用すると、かなり感度向上が期待できるものとみられるのでこれについて検討してみた。

Fig. 11 は、SC-01 カラムを用いて分離したピレンを臭化カリウム錠剤に捕集した後、FT-IR でスペクトルを測定した結果である。Fig. 2 と比較してみると 0.8 μ g でも特性吸収がみられ、感度は約一けた向上していることが分かるが、感度向上が $10^2 \sim 10^3$ 程度と予測したにもかかわらずはるかに低感度である。しかも、実験を通じて FT-IR でもビームコンデンサー装置が必要であることが明らかとなった。装置の安定性などの改良に伴ってまだまだ高感度化が期待できると考えられるので、今後更に検討することになっている。

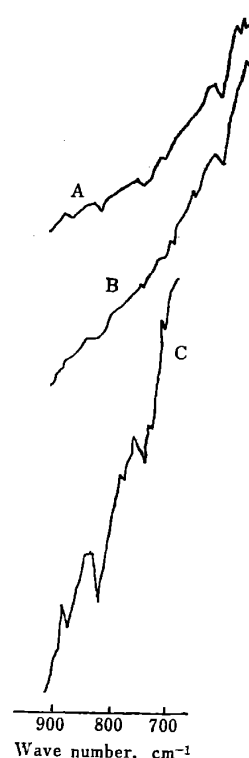


Fig. 11 Fourier transform infrared spectra (Accum. 64 times)

A : Pyrene 2.4 μ g; B : Pyrene 0.8 μ g; C : A $\times$ 5 T (%)

4 結 語

マイクロ高速液体クロマトグラフィーと赤外吸収スペクトルの結合時のバッファメモリとして臭化カリウム錠剤を用いる方法について報告した。

本方法の最も大きな利点は、MHPLC により分離された成分のクロマトグラムが長時間保存でき、一定の保存条件下で安定な試料については必要に応じていつでも測定したクロマトグラムを容易に再現可能なことである。

終わりに、本研究に際し FT-IR の使用で御援助を頂いた工業技術院名古屋工業技術試験所石塚紀夫氏に感謝します。

(1979 年 10 月, 第 10 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会特別討論会「液体クロマトグラフの高性能化」において一部発表)

文 献

- 1) D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi, M. Nagaya : *J. Chromatogr.*, **144**, 157 (1977).
- 2) D. Ishii, A. Hirose, K. Hibi, Y. Iwasaki : *J. Chromatogr.*, **157**, 43 (1978).
- 3) D. Ishii, K. Hibi, K. Asai, T. Jonokuchi : *J. Chromatogr.*, **151**, 147 (1978).
- 4) D. Ishii, A. Hirose, I. Horiuchi : *J. Radioanal. Chem.*, **45**, 7 (1978).

- 5) W. H. McFadden, H. L. Schwartz, S. Evans : *J. Chromatogr.*, **122**, 389 (1976).
- 6) P. R. Jones, S. K. Yang : *Anal. Chem.*, **47**, 1000 (1975).
- 7) D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegle, E. C. Horning : *Anal. Chem.*, **47**, 2369 (1975).
- 8) F. W. McLafferty, R. Knutti, P. Venkataraghaven, P. J. Arpino, B. G. Dawkins : *Anal. Chem.*, **47**, 1503 (1975).
- 9) T. Takeuchi, Y. Hirata, Y. Okumura : *Anal. Chem.*, **50**, 659 (1978).
- 10) C. R. Blakley, M. J. Macadams, M. L. Vestal : *J. Chromatogr.*, **158**, 261 (1978).
- 11) S. Tsuge, Y. Hirata, T. Takeuchi : *Anal. Chem.*, **51**, 166 (1979).
- 12) M. Lemar, P. Versaud, M. Portault : *J. Chromatogr.*, **132**, 295 (1977).

☆

Investigation on buffer memory of the chromatograms with KBr disks. (Studies on the combination of micro high performance liquid chromatography and infrared absorption spectrometry. I.) Kiyokatsu JINNO, Chuzo FUJIMOTO, Masayoshi IDEHIRA*, late Tsugio TAKEUCHI and Daido ISHII** (*School of Materials Science, Toyohashi University of Technology Tempaku-cho, Toyohashi-shi, Aichi; **Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi)

The microscale liquid chromatographic technique has been recently developed. The technique requires

only small quantities of sample, carrier and packing material, and the associated instrumental components can be simplified more than those of conventional high performance liquid chromatographs on the market. Therefore, it is very easy to combine liquid chromatography with spectrometric techniques such as mass spectrometry or infrared absorption spectrometry. In this study, we investigated the combination of micro high performance liquid chromatography and infrared absorption spectrometry with use of KBr disk as buffer memory. Our results indicate that KBr disk-buffer memory are very useful to reproduce the detected chromatograms easily, when necessary. We also examined the applicability of Fourier transform infrared spectrometer for the present method, and could enhance the sensitivity of the present method. We have developed an automatic equipment for collecting eluate on the KBr buffer memory. This equipment would enable us to obtain the infrared chromatograms of pyrene lower than 10 micrograms as readily as ultraviolet chromatograms.

(Received Nov. 8, 1979)

Keywords

Buffer memory

Collecting equipment

Infrared absorption spectrometry

Infrared chromatogram

Micro high performance liquid chromatography

Potassium bromide

赤 外 分 析 へ の 偏 回 帰 係 数 比 の 応 用

中 沢 章*

(1979 年 7 月 19 日受理)

混合物の赤外スペクトル分析に極めて重複した波形しか利用できない場合、数学的にそれらを分離し、各含有成分を定量する方法を提案した。混合物の重複波形全体を等分割し、各点をキーバンドに相当する測定点とした。あらかじめ、各含有成分の純品についても同様に吸光度を測定しておき、それらの吸光度と混合物のそれとの間に重回帰モデルを想定すると、その偏回帰係数は含有成分の濃度に比例するので、混合物中の任意の2成分間の濃度比と偏回帰係数比との間には直線関係が成立し、しかも測定時の試料の厚さは任意でよい。本法によって、亜鉛及び銅の8-ヒドロキシキノレートのおずかな吸収帯のシフトの差を利用して、その共沈殿物の分析が可能であることを示した。

* 長岡工業高等専門学校：新潟県長岡市西片貝町 888