

セミクロ高速液体クロマトグラフィーにおける 共鳴ラマン検出法

小 泉 均[®], 鈴木 義仁*

(1988 年 1 月 8 日受理)

低級脂肪族アミン及び置換フェノール類を塩化 4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-スルホニル (Dabsyl-Cl) と反応させ、又脂肪族アルデヒドはダブシルヒドラジンと反応させダブシルヒドラゾンとして共鳴ラマン効果が期待できる誘導体に変換した。これらの誘導体は逆相セミクロカラム (μ S-Finepak C18, 1.5 mm ϕ $\times$ 250 mm) で分離後、その溶離成分をアルゴンイオンレーザー 488.0 nm の発振波長を用いて 1136 cm^{-1} で共鳴ラマン検出を行った。レーザー出力、スリット幅、スムージング数など検出感度に影響を与える要因の検討を行い、ラマン検出の最適条件を調べた。その結果、従来の内径 4.6 mm のカラムを使用した LC/ラマン検出と比べて検出限界は絶対注入量で 20 倍向上し、2 ng まですべて検出可能であった。

1 緒 言

レーザーラマン分光法は化合物の振動スペクトルが得られるので有用であるが、更に共鳴効果が利用できるならば希薄濃度でも測定が可能となり微量分析法としても優れた方法となる¹⁾²⁾。特に水のラマン光は微弱なので、溶媒に水を使用することができる。著者らはこの点に着目して逆相液体クロマトグラフ系で脂肪族アルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体を HPLC 分離後、溶出液を塩基性にしてアルゴンイオンレーザー (以後 Ar⁺ レーザーと略記) の発振波長 488.0 nm の可視吸収バンドにシフトさせ、共鳴ラマン効果により微量検出を可能とした³⁾。

レーザーラマン分析法の HPLC への応用の大きな利点は集光レンズを経てレーザー光をフローセルに照射させるため、照射面が極めて微小なことである。このためラマンフローセルは紫外検出器や蛍光検出器と比べてセル容量は無視できるほど小さい。従って、カラム中でのクロマトグラムの分離能を損なうことなく検出できる。本報はこの点に着目して、通常の分析カラム (内径 4.6 mm) の 1/3~1/10 のカラムサイズで操作されるマイクロやセミクロ HPLC の検出器としてレーザーラマン分析法の応用を試みた。

このような共鳴ラマン検出法を広範囲な分野へ拡張す

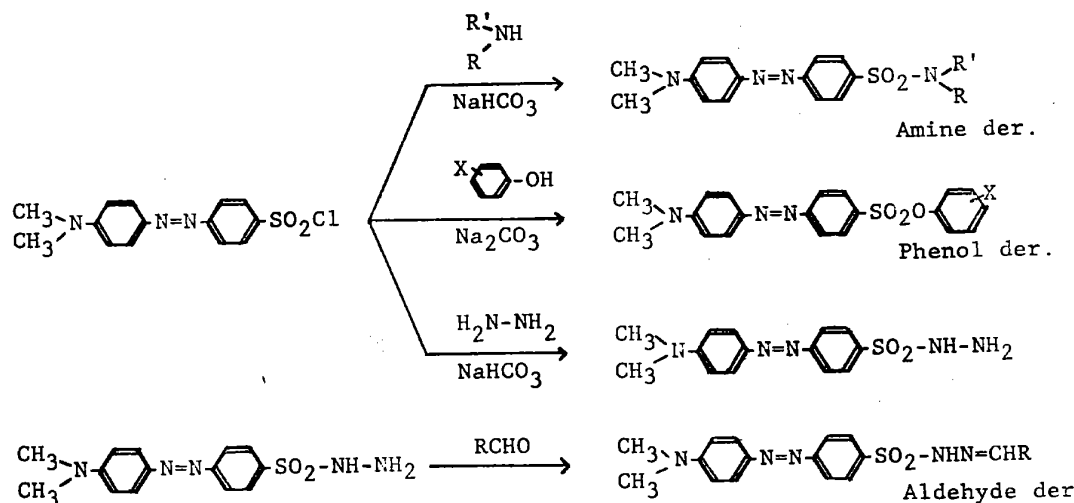
るためには各種化合物に対して共鳴ラマン効果が期待できる試料誘導体化法を確立しておく必要がある。レーザー光源としての Ar⁺ レーザーは 488.0 nm と 514.5 nm に大きな出力を持っている。そこで試料の可視吸収バンドがこれらの発振波長又はその近傍に存在するように誘導体化を行う必要がある。脂肪族アミン及びフェノール類は塩化 4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-スルホニル (ダブシルクロライド) と反応させ、又脂肪族アルデヒドはダブシルクロライドとヒドラジンより合成したダブシルヒドラジンとの反応によりダブシルヒドラゾン誘導体としてそれぞれセミクロ HPLC により同族体混合物を相互分離した後、共鳴ラマン検出を行うための基礎的な検討を行い、セミクロ HPLC/ラマン分析法を確立した。

2 実 験

2.1 誘導体及び装置

2.1.1 誘導体 脂肪族アミン及び脂肪族アルデヒドの誘導体は既報の方法⁴⁾⁵⁾ で合成したものをを用いた。誘導体化の反応式を次に示す。又フェノール類はアミンと同様にラマンラベル化剤としてダブシルクロライドを用いてダブシルエステル誘導体を得た。アミン及びアルデヒド誘導体はいずれも基本骨格が同じため吸収極大波長 (λ_{max}) は 440 nm であり、この波長におけるモル吸収係数 (ϵ) は 3×10^4 であった。しかしフェノール類では、フェノールのダブシルエステル誘導体の λ_{max} は 450 nm, ϵ は 3.8×10^4 から、2,4-ジニトロフェノールのダブシルエステル誘導体の λ_{max} は 470 nm, ϵ は

* 山梨大学工学部工学基礎教室 : 400 山梨県甲府市武田 4-3-11



3.6×10^4 の間に各誘導体の置換基及び置換位置により異なるスペクトルとなることが分かった。これらの化合物は Ar^+ レーザーの発振波長とは若干吸収極大はズレているが共鳴ラマン効果が期待できることが判明した。

2.1.2 装置 本報で用いたセミマイクロ HPLC/ラマン検出の概略図を Fig. 1 に示した。HPLC 分離にはポンプに日本分光 TRI ROTAR V 型, カラムは μS -Finepak C18 (1.5 mm ϕ $\times$ 250 mm), セミマイクロインジェクター ML-425 (注入量 1 μl) をそれぞれ使用した。分離条件や本報の検出法と比較検討するため紫外検出器 (日本分光 UVIDEC-IV) も併用した。レーザー光の照射されるセル中で気泡の発生を防ぐために, 移動相に用いたアセトニトリル-水混合溶媒は減圧下で十分脱気して使用した。

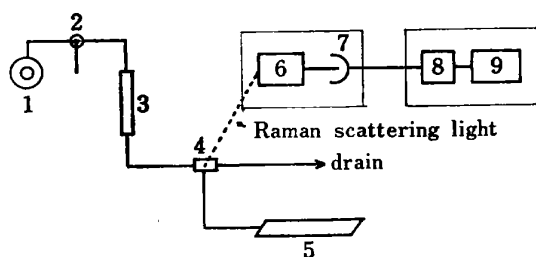


Fig. 1 Schematic diagram of HPLC/Raman experimental apparatus

1: HPLC pump, 2: injector, 3: column, 4: flow cell, 5: Ar ion laser, 6: monochromator, 7: photomultiplier, 8: digital photon counter, 9: recorder

ラマン検出は日本電子 JRS-400T レーザーラマン分光光度計にデジタル光子カウンター (DP-041 型) を付設して用いた。レーザー管は東芝アルゴンイオンレーザー LAI-104A (総出力 2 W) である。Fig. 1 中のフローセルは平滑表面を持つセミマイクロ用蛍光ローセル (セル容量 3 μl) を転用, このセルの一部分にレーザー光を照射した。セル上のレーザー光束は約 100 μm に集束されているので実効セル容積は約 100 nl である。

3 結果及び考察

3.1 HPLC 分離条件

脂肪族アミンのダブシルアミド誘導体, 脂肪族アルデヒドのダブシルヒドラゾン誘導体, フェノール類のダブシルエステル誘導体それぞれについて紫外検出器 (検出波長 440 nm) を用いて分離条件を検討した。移動相のアセトニトリル-水混合溶媒の組成をアセトニトリル 90% から 60% まで変え, そのときの容量比の対数 ($\log k'$) を求めた。移動相の流量は 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ である。その結果, アミンのダブシルアミド誘導体では 70% アセトニトリル-水, アルデヒドのダブシルヒドラゾン誘導体では 75% アセトニトリル-水系で良好な分離を示した。しかしフェノール類のダブシルエステル誘導体はベンゼン環の置換基あるいは置換位置の相違だけであるため $\log k'$ が非常に接近した結果となった。従って合成した 12 種類の誘導体の一斉分離は困難であった。

3.2 ラマン検出条件の最適化

検出感度に影響を与える要因としてスリット幅, レーザー出力が考えられる。又, クロマトグラムのピーク形状に影響を与える因子としてはパルスの積算時間や感度にも関与するスムージングポイント数などがある。試料のプロピルアミンのダブシルアミド誘導体 (15.2 ng/ μl) の一定量を HPLC に注入して得られたクロマトグラムのピーク高さ, 形状について検討した。

スリット幅: 500 μm から 900 μm まで 100 μm ごとにスリット幅を広げていくと, 分解能は低下するが, その分 1136 cm^{-1} のラマンバンドのすそまで検出することができるため, クロマトグラムのピーク高さは徐々に増加した。従って 800 μm に設定すると 500 μm の 1.6 倍感度の向上が見られた。

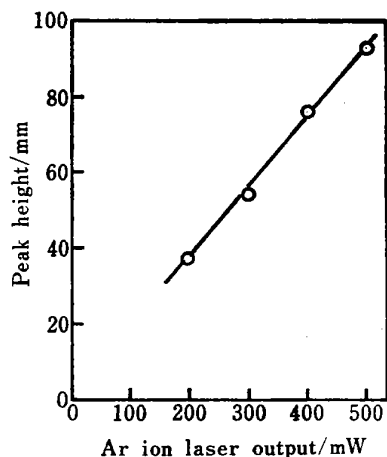


Fig. 2 Effect of Ar ion laser output on Raman peak height

Raman detector : 1136 cm^{-1} , 1000 pulses full scale; Integration time : 2.5 s; Smoothing point : 8, Slit : $800\text{ }\mu\text{m}$, 10 mm. Sample : propylamine-dabsyl derivative 15.2 ng

レーザー出力：レーザー出力と得られたクロマトグラムのピーク高さとの関係を Fig. 2 に示した。

レーザー出力の増加と共に試料中を通るレーザー光により散乱されるラマン光の強度は直線的に増加した。レーザー出力が強ければ強いほど検出感度は向上するが用いたレーザー管の総出力は 2 W であり、488.0 nm では出力を最高 700 mW まで上げることが可能であるが長時間の安定性を考慮して 500 mW の発振状態を限界として設定することにした。

スムージングポイント数：0, 2, 4, 8 ポイントとポイント数を変えピーク高さとノイズの大きさについて調べた。その結果を Fig. 3 に示した。

ポイント数が増加するに従いピーク高さは減少したが同様にノイズも減少した。8 ポイントのスムージングを行った場合にはスムージングを行わない場合に比べて、ピーク高さは 2/3 に減少するがベースラインのノイズの大きさも 1/2 に減少することが分かった。従って希薄な濃度の試料を検出するためにはベースラインの安定性が良好なことが、S/N 比のよいクロマトグラムを得るために必要である。従って以後の実験では 8 ポイントのスムージング処理を行うこととした。以上の結果をまとめて最適のラマン検出条件を Table 1 に示した。

3.3 ラマン検出によるピーク高さの再現性

ラマンスペクトルを測定するとノイズの多いバンドがしばしば観測される。従って HPLC/ラマン検出を行う場合にピークの再現性を得ることは重要である。特に微

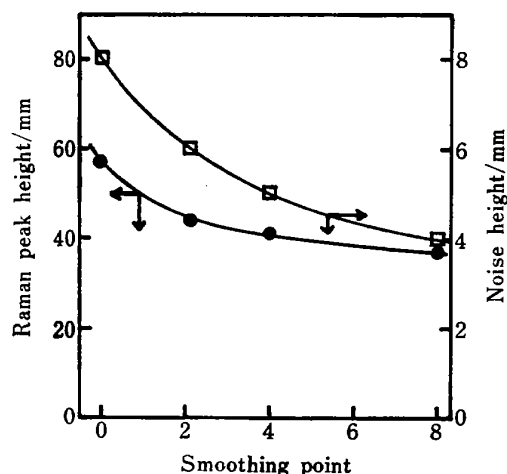


Fig. 3 Effect of smoothing point on peak height and noise height

Raman detector : 1136 cm^{-1} 1000 pulses full scale; Integration time : 2.5 s; Slit : $800\text{ }\mu\text{m}$, 10 mm; Ar ion laser : 488.0 nm, 300 mW output; Sample : propylamine-dabsyl derivative 15.2 ng

Table 1 The optimum condition of Raman detection

Ar ion laser	488.0 nm, 500 mW output
Detection wavenumber	1136 cm^{-1}
Pulse integration time	2.5 s
Smoothing point number	8
Slit width	800-850-800 μm
Slit height	10 mm

量成分についてはピーク高さが検出限界を決定するので特に重要となる。Ar⁺ レーザー光路中のセルの位置により観測されるラマン強度は著しく変化する。そこで使用前には必ずアセトニトリルをセルに満たし 920 cm^{-1} のバンド強度を測定し常に最高感度が得られるようにセルの位置を調整して実験を行った。ピーク高さの再現性の測定にはプロピルアミンのダブシルアミド誘導体 ($15.2\text{ ng}/\mu\text{l}$) の $1\text{ }\mu\text{l}$ を 6 回連続注入して、そのピーク高さの変動を調べた。ラマン光の感度は 1000 pulse/2.5 s フルスケールとした。再現性の評価には絶対ピーク高さ法を用いたが平均ピーク高さは 92 mm であり、その相対標準偏差は 1.77% と良好であり、連続して繰り返し測定できることが分かった。

なお、最適なラマン検出で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

3.4 検量線と検出限界

検量線の一例としてプロピルアミンのダブシルアミド

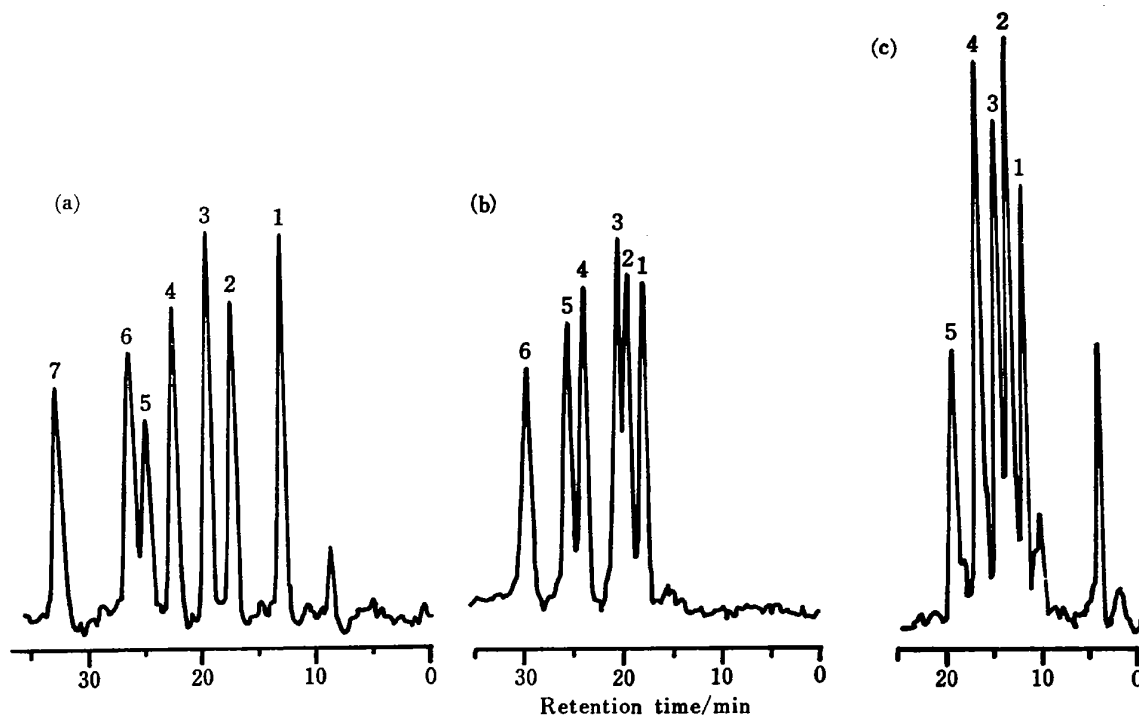


Fig. 4 Chromatograms of three dabsyl derivatives with Raman detection

(a) mobile phase : 70% acetonitrile/water, 50 µl/min; 1 : ammonia, 2 : methylamine, 3 : ethylamine, 4 : propylamine, 5 : dimethylamine, 6 : butylamine, 7 : diethylamine; Concentration = about 10 ng each. (b) mobile phase : 80% acetonitrile/water, 50 µl/min; 1 : *o*-nitrophenol, 2 : *p*-nitrophenol, 3 : phenol, 4 : *p*-cresol, 5 : *p*-chlorophenol, 6 : 2,4-dimethylphenol; Concentration = about 16 ng each. (c) mobile phase : 75% acetonitrile/water, 50 µl/min; 1 : ethanal, 2 : propanal, 3 : butanal, 4 : pentanal, 5 : hexanal; Concentration = about 25 ng each

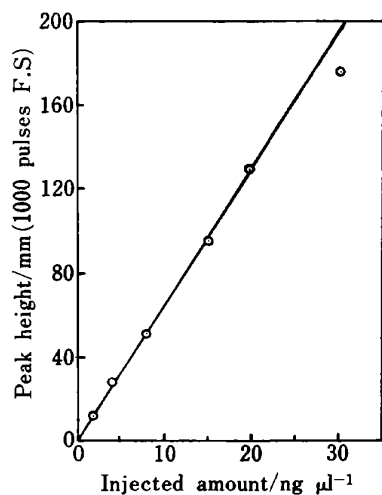


Fig. 5 Calibration curve for propylamine-dabsylamide

誘導体の検量線を Fig. 5 に示した。

検量線は 2~20 ng/µl まで直線性を示した。しかしこの範囲以上の高い濃度では直線から負に逸脱した。この原因はセル中での励起光の吸収及び散乱光の再吸収などによる自己吸収に起因すると考えられ、検量線の濃度

範囲を大きくすることはできない。又、プロピルアミンのダブシルアミド誘導体では、ラマン検出限界 $S/N=2$ として絶対注入量 2 ng であった。本法は既に報告した 4.6 mmφ のカラムを用いた場合の検出限界⁴⁾と比べて絶対注入量で 20 倍少ない量でも検出可能であった。

ラマン散乱光はほとんどすべての物質から観測されるが通常のラマン強度はそれほど強くなく、微量分析を行うことは非常に困難であり、 10^{-2} M 程度が検出限界である。しかし本報で用いたように共鳴ラマン効果が期待できる誘導体化を行い、更にセミマイクロ HPLC と組み合わせることにより微量成分相互の分離検出が可能となった。又、誘導体化操作を行うことによりマトリックス中の共存物質の影響を少なくすることができるため複雑な試料の分析へも適用が可能となる。

更にレーザーラマン検出法はセル容量が無視できるほど小さいためマイクロやセミマイクロ HPLC のバンドの広がり小さいという特質を損なうことなく検出できる利点があり、本報により検出器として有効であることが示された。なお現在普及している Ar^+ レーザーの発振波長よりも短波長側に励起波長のある紫外レーザーや色

素レーザーの開発は各種有機物の誘導体化の制限を緩和でき、微量成分分析のためには有効な分析法となり得る。

本研究の一部は 1986 年度文部省科学研究費補助金 (課題番号 61550555) によった。

文 献

- 1) S. Higuchi, J. Tanaka, S. Tanaka : *J. Spectrosc. Soc. Jpn.*, **27**, 353 (1978).
- 2) L. V. Haverbeke, P. F. Lynch, C. W. Brown : *Anal. Chem.*, **50**, 315 (1978).
- 3) 小泉 均, 小島久尚, 鈴木義仁 : 分析化学, **30**, 99 (1981).
- 4) 小泉 均, 越山博喜, 鈴木義仁 : 分析化学, **34**, 63 (1985).
- 5) 小泉 均, 越山博喜, 鈴木義仁 : 分析化学, **34**, 376 (1985).

☆

Resonance Raman detection in semi-micro HPLC. Hitoshi KOIZUMI and Yoshihito SUZUKI (Department of Basic Engineering, Faculty of Engineering, Yamanashi University, 4-3-11, Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400)

A semi-micro HPLC coupled with a resonance Raman

detection was described. For sensitive Raman detection, aliphatic amines and substituted phenols were derivatized with dabsyl chloride (4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride). Also aliphatic aldehydes were derivatized with dabsyl hydrazine. These derivatives were separated on semi-micro column (μ S-Finepak C18, 1.5 mm i.d. $\times$ 250 mm). Derivatives eluted from the column were monitored continuously by measuring the intensity of resonance Raman scattering at 1136 cm^{-1} with the 488.0 nm line of Ar ion laser. Peak height and/or peak shape of chromatograms would be influenced by various factors such as power of laser output, photon integration time, slit width of monochromator, smoothing point number and so on. Effect of above factors on Raman detection was investigated. Under optimum conditions for Raman detection, the lower detection limit of 2 ng with *n*-propylamine-dabsyl amide was obtained. The lower detection limit of this method was 20-fold better than that of the conventional column used in comparison with injected amounts.

(Received January 8, 1988)

Keyword phrases

resonance Raman detection; separation on semi-micro column; derivatization for resonance Raman effect.