

技術論文

イオン抑制高速液体クロマトグラフ溶出物のピンポイント濃縮/顕微フーリエ変換赤外分光法による同定法の検討

森野 由香^{®*}, 山本 信也^{**}, 石渡 勝己^{*}, 高松 翼^{*}

Study on the identification of an eluate from ion-suppression HPLC by microscopic FT-IR using the pinpoint concentration

Yuka MORINO^{*}, Shinya YAMAMOTO^{**}, Katsumi ISHIWATA and Tasuku TAKAMATSU^{*}^{*}Safety & Analytical Research Center, R & D Headquarters, Shiseido Co., Ltd., 1050, Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223^{**}Pharmaceutical Department, Kakegawa Factory, Shiseido Co., Ltd., 1120, Nagaya, Kakegawa-shi, Shizuoka 436

(Received 28 March 1997, Accepted 13 May 1997)

The identification of an eluate from ion-suppression HPLC using a water/methanol mobile phase containing trifluoroacetic acid was investigated using the pinpoint (PP) concentration and a microscopic reflection FT-IR measurement. Sodium-5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzenesulfonate was chosen as the standard, since it has been formulated in many cosmetic products at a fairly low level as a UV absorber. The absorbance of the background spectrum, mainly due to a trifluoroacetic acid residue, could be minimized by using a centrifugal vacuum concentrator with a polypropylene tube for fractionation. An evaluation of the identification limit of the obtained spectrum was carried out using a commercially available IR spectra retrieval system with an attached spectra database and a custom-made database comprising of spectra obtained by the PP concentration; also the degree of agreement between the database and the sample spectra, were used as an index of the identification limit. By spectral retrieval using a range of wavenumbers from 2000 to 700 cm^{-1} , the identification limit was found to be 500 ng for the HPLC eluent of the standard and 2 μg for that of the cosmetic lotions when retrieved against the PP-standard spectra.

Keywords : ion-suppression HPLC; microscopic FT-IR; IR spectra retrieval system.

1 緒 言

近年, 各種の分離分析機器と構造解析機器とを結合させる, いわゆる “hyphenated technique” の研究, 開発

が盛んに行われ, 中でも対象化合物の範囲が広い LC と各種構造解析機器との結合が最大の関心を集めている. LC/IR もその例外ではなく, フローセルを用いた方法では, クロロホルム等の赤外不活性な溶媒を用いることのできるゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)/IR が既に一般的に普及している¹⁾²⁾. 又, 溶媒除去法によるものでは, 各種インターフェースが開発されてはいるものの^{3)~5)}, 日常的に使用可能な実用機となったもの

^{*} (株)資生堂研究開発本部安全性・分析センター: 223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050

^{**} (株)資生堂掛川工場製薬部: 436 静岡県掛川市長谷 1120

の例は少ない。この理由の一つには、HPLC の移動相に揮発性の溶媒のみを用いる場合が少ないことが挙げられ、コストパフォーマンス面が実用化の障害となっているとも考えられる。一方、オフライン結合ではあるが、HPLC からの溶出物を簡易的に IR 測定する方法として、池田らにより開発されたピンポイント (PP) 濃縮法⁶⁾が知られており、コスト面そしてはん用性面を考慮すると有効な方法である。これは金属鏡面上のはっ水性フッ素系高分子薄膜に微量の溶液を滴下すると、溶媒の蒸発とともにスポット径が小さくなり、最終的には濃縮された試料の微小径が形成され、これを顕微反射測定するものである。ほかに焼結 KBr 板の頂点に溶質を集めるウィックスティック法⁷⁾、KBr 粉末を満たしたマイクロサンプリングカップに試料溶液を滴下して乾燥後、拡散反射法により測定する方法、あるいは加工したセレン化亜鉛の凹型に試料溶液を滴下して乾燥後、顕微透過法により測定する方法⁸⁾等も知られているが、感度面で PP 濃縮法に勝るものはない。しかし、この PP 濃縮法においても、HPLC 移動相に対する限定は依然残されている。すなわち、溶出液中の酸、塩等の添加物はもちろん、微量の不純溶出物も同時に濃縮されてしまうため、バックグラウンドの影響が大きくなることであり、原理的に自明の理でもあることから酸、塩を含む移動相を用いる HPLC に検討された例はない。

化粧品はもちろん、その原料も極めて多くの成分の混合物であり、微量未知成分の同定には各種の “hyphenated technique” が利用されている。しかし、最もはん用化されている GC/MS、HPLC/MS のみでは同定が困難であることから、感度面では数 μg と必ずしも十分ではないものの、セミマイクロ HPLC/¹H-NMR⁹⁾ のはん用的利用について検討されている。これら微量成分の同定には官能基情報が得られ、かつスペクトルデータベースが充実している IR が必要不可欠である一方、移動相に酸、塩を添加するイオン抑制 HPLC における PP 濃縮法利用の限界が明らかにされていない。著者らは、HPLC の移動相として、最も多用されている逆相分配におけるイオン抑制法であるトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む水-メタノール系の移動相からの溶出液を PP 濃縮し、顕微反射測定する方法の最適化を行い、得られたスペクトルの同定能力について検討したので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

顕微 FT-IR 装置は検索システム付属の Bio-Rad 製 FTS-40 に UMA-300 顕微測定システムを接続し、検出

には MCT (Hg-Cd-Te) 検出器を用いた。検索システムは Digilab 製 SEARCH 32 (標準 IR スペクトルデータベースはサドラーの約 60000 スペクトルからなる) を用いた。測定は反射法で行い、可変アパーチャーサイズを $150\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m}$ 、分解能を 8 cm^{-1} 、256 回積算を条件とした。PP 濃縮板には堀場製作所製 PP 測定用サンプルプレート FX-210 を、HPLC 装置には紫外外部検出器付属の横河電機製 LC 100 System に Series 1050 オートインジェクター、スガイ化学工業製カラム恒温槽 U-620 型を接続し、カラムは資生堂製 Capcell Pak C₁₈ UG ($4.6\text{ mm}\phi \times 25\text{ cm}$) を使用した。

2.2 試料及び試薬

標準試料とした 5-ベンゾイル-4-ヒドロキシ-2-メトキシベンゼンスルホン酸ナトリウム (BHMS) は東京化成製を用いた。これを標準試料とした理由はイオン抑制法によりカラムに保持され、かつ KBr 錠剤法による IR スペクトルを Fig. 1 に示すように、 3480 cm^{-1} 付近の OH 基伸縮振動から 1620 cm^{-1} 付近の C=O 基伸縮振動、 1270 cm^{-1} 付近の OH 基変角振動、 920 及び 830 cm^{-1} 付近の芳香環の面外変角振動まで幅広い波数領域に多くの吸収を持つために、同定能力を評価するのに最適と判断したことによる。又、BHMS は化粧品中に退色防止等の目的で微量配合される紫外線吸収剤であり、その配合量が 0.1% 程度であることから本報の目的に合致するものである。

HPLC 移動相及び試料の溶解に用いたメタノールはナカライテスク製 HPLC 用、水はミリポア製の Milli-Q 精製システムを通過させたもの、TFA は和光純薬製

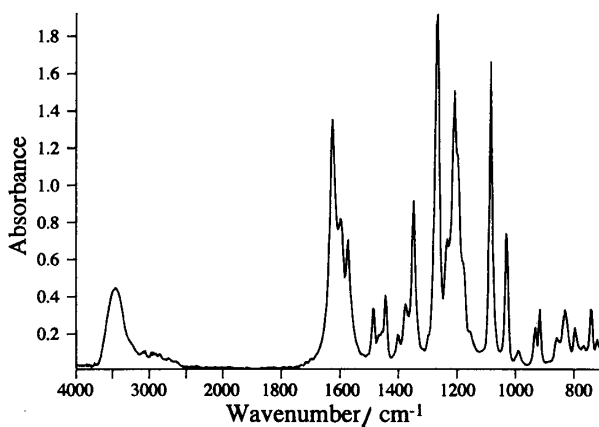


Fig. 1 IR spectrum of BHMS taken by a transmission mode (KBr tablet)

Resolution: 8 cm^{-1} ; Number of scans: 64

試薬特級を用いた。BHMS は HPLC 移動相条件が 0.1% TFA を含む水:メタノール=4:6, 流量毎分 1 ml, カラム温度 40°C で保持時間約 5 分に溶出し, 試験溶液の注入量 10 μ l, 検出波長 325 nm として BHMS が溶出する付近の約 1 ml を分取した。

2.3 標準操作法

HPLC 溶出液約 1 ml を 1.5 ml γ 線滅菌済みポリプロピレン容器に分取し, 20°C, 3 時間遠心真空濃縮して移動相を除去した。これにメタノール 30 μ l を加え, 100 μ l マイクロシリンジでこれを採取し PP 濃縮板に 1 滴ずつ滴下した。風乾と滴下を繰り返し, 微小径を形成させた。なお, 溶出液採取量 1 ml は, 通常の溶出ピーク全域を採取可能な量として暫定的に設定したものである。

2.4 同定限界の検討

IR スペクトルの同定能力の評価には, KBr 錠剤法で得た標準スペクトルの特性吸収との比較による主観的方法に加えて, なんらかの客観的指標として一般的に用いられているスペクトルデータベース検索を用いた。この検索システムのアルゴリズムは, 最小二乗法に従う以下の式で計算される HQI (hit quality index) 値であり, 得られたスペクトルはこの値及びヒット順位, 上位にヒットしたほかの化合物等を総合的に比較, 評価した。HQI 値は小さいほど, 標準スペクトルとの一致度が高いことを示している。

$$(\text{HQI})^2 = \sum \{(Uw/|U|) - (Li w/|Li|)\}^2$$

U : 未知スペクトル信号, $|U|$: 未知スペクトル信号の総和, Li : ライブラリースペクトル信号, $|Li|$: ライブラリースペクトル信号の総和, w : 波数 ($\Delta w = 4 \text{ cm}^{-1}$)

3 結果と考察

3.1 BHMS メタノール溶液の PP 濃縮/顕微反射スペクトル

BHMS のメタノール溶液を各種濃度に調製し, その 30 μ l を PP 濃縮板に徐々に滴下して乾燥後, 2 μ g~10 ng までの 7 水準において顕微反射スペクトルを測定した。100 ng の結果を Fig. 2 に示す。Fig. 1 と比較して溶媒であるメタノールの残存と思われる 3450 cm^{-1} 付近の OH 基伸縮振動による吸収が増大し, 2920 cm^{-1} 付近の CH 基伸縮振動による吸収, 及び 1600, 1200

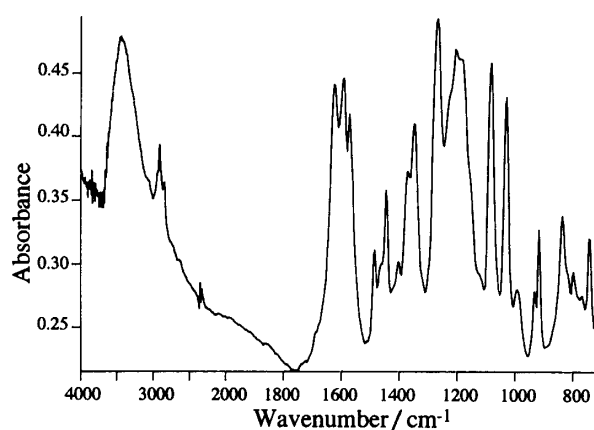


Fig. 2 PP concentrated-microscopic reflection IR spectrum of BHMS methanol solution (100 ng)

cm^{-1} 付近の吸収強度の増加が見られた。これらを測定波数全領域の 4000~700 cm^{-1} でスペクトル検索した結果, 2 μ g~500 ng までは HQI=0.28~0.39 で, それぞれ 1 位にリストされたが, 100 ng では HQI=0.48 で 11 位に低下し, 50 ng 以下では 20 位までにリストされなかった。HQI 値の急激な上昇は, 検索波数幅を 4 cm^{-1} に設定していることから, 強度が高く, ブロードな吸収の影響によるものと考えられた。HQI 値の上昇したスペクトルと Fig. 1 に示した KBr 錠剤法によるスペクトルとの主な違いは, ブロードな 3450 cm^{-1} 付近の OH 基の吸収にあると考え, 検索範囲を 2000~700 cm^{-1} に絞って検索した。その結果, 2 μ g~50 ng までが HQI=0.28~0.38 で 1 位が拡大され, 検索波数の範囲を絞ることにより HQI 値を向上することができた。25~10 ng ではいずれの検索範囲においても 20 位までにリストされなかった。従って, 標準スペクトルとの一致度による BHMS メタノール溶液の PP 濃縮/顕微反射スペクトルの同定限界は 50 ng と判断された。10 ng でも BHMS の主たる特性吸収は認められたが, 各吸収の相対強度は 50~25 ng 付近で急激に変化し, HQI 値の変化が裏付けられた。しかし, 特性吸収のみに注目するならば, pg オーダーでの分析も可能と思われた。1600, 1200 cm^{-1} 付近の吸収強度の増加の原因を特定するには至らなかったが, 1200 cm^{-1} 付近のブロードな吸収については, PP 板のフッ素系高分子由来との予測に基づき, PP 板のみのスペクトルを検討した。しかし, この吸収強度はかなり低く, 又 1250~1110 cm^{-1} の吸収を削除して検索する検討も行ったが, HQI 値に変化は現れなかった。従って, 以後の検討ではスペクトルの検索範囲を 2000~700 cm^{-1} とした。

3・2 HPLC 溶出液の PP 濃縮/顕微反射スペクトル

まず、バックグラウンドとなる HPLC 溶出液 1 ml を分取し、溶媒留去後、メタノール 30 μ l に再溶解し、これを PP 濃縮後、顕微反射測定した。分取容器にはガラス製とポリプロピレン製を、溶媒留去については凍結乾燥法と遠心真空濃縮法 (20°C, 3 時間) を比較した。イオン抑制 HPLC で用いた TFA は溶媒留去の際に揮散すると思われたが、カラムによっては充てん剤あるいは HPLC 系内の不純物である金属と塩を形成し、残留したものと考えられた。すなわち、1700, 1400, 1000 $\sim$ 1200 cm^{-1} 付近に一連の吸収が観察された。バックグラウンドスペクトルのメインは 1700 cm^{-1} 付近の C=O 基伸縮振動に由来する吸収であり、ガラス容器で遠心真空濃縮したものの吸光度は 0.6 程度となり、ガラス容器から溶出する微量金属と TFA の反応が疑われた。ポリプロピレン容器で遠心真空濃縮したものの吸光度は 0.04 程度とかなり低下し、Fig. 3 に示すようなスペクトルとなった。同容器で凍結乾燥したものの吸光度は 0.1 程度であったことから、バックグラウンドスペクトルの吸光度が最も小さかった。ポリプロピレン容器で分取し、遠心真空濃縮する方法を選択した。カラムロット、洗浄効果等についても検討したが、塩の形成もあり、分取液 1 ml 中に存在する約 1 mg の TFA を完全に除去することはできなかった。従って、このバックグラウンドは不可避であり、かつこれが限界であると考えられた。又、バックグラウンドスペクトルには、カラム充てん剤のオクタデシル基由来と考えられる 2800 $\sim$ 2900 cm^{-1} のアルキル基の吸収も検出された。

次に、BHMS 2 μ g $\sim$ 160 ng の溶出ピークを分取し、標準操作法に従い顕微反射測定した。得られたスペクトルについて検索した結果、上位にはベンジル基、トルエンスルホン酸基など同じような官能基を持つ化合物がリストされたものの、2 μ g で HQI 値 0.58 を示し 20 位以下となった。このスペクトルを Fig. 4 に示したが、先に挙げたバックグラウンドのうち 1700 及び 1170 cm^{-1} 付近の吸収の影響が顕著であった。これらの吸収が不可避であることは前述のとおりであるため、濃縮由来の吸収の影響を除くことを目的として、2 μ g $\sim$ 10 ng までの 7 種の BHMS メタノール溶液の PP 濃縮/顕微反射スペクトルをライブラリーに登録し、改めて検索した。結果を Table 1 に示すが、HPLC 溶出物 4 種とも最も低い HQI 値を示したものは 10 ng メタノール溶液であり、試料量に対応するスペクトルの一致関係は見られなかった。もちろん、移動相溶媒 1 ml の分取物では HQI 値は 1.0 $\sim$ 1.09 となり、極めて一致度は低いもの

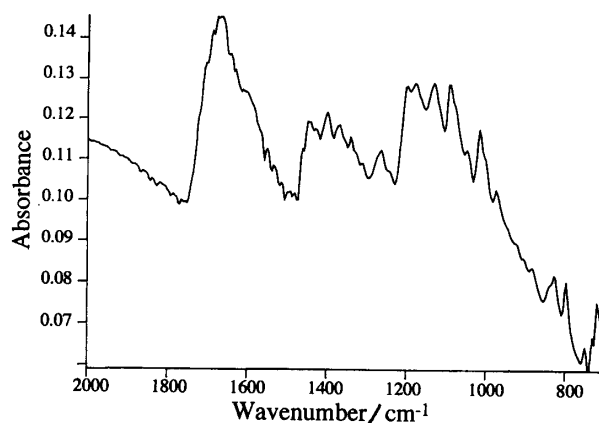


Fig. 3 PP concentrated-microscopic reflection IR spectrum of the blank HPLC eluent (1 ml)

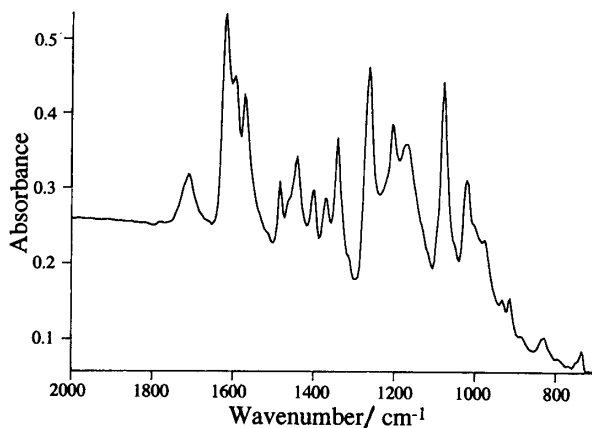


Fig. 4 PP concentrated-microscopic reflection IR spectrum of BHMS (2 μ g) fractionated by HPLC

であった。この検索において、BHMS 量 500 ng までは上位にリストされたことから、BHMS の HPLC 溶出液の PP 濃縮/顕微反射スペクトルは、サドラー標準スペクトルとの一致度は低く、標準として用いた BHMS メタノール溶液の PP 濃縮/顕微反射スペクトルと一致する最少量としては 500 ng 必要であると判断された。この結果は、PP 濃縮/顕微反射測定法及び KBr 錠剤法によるスペクトル間の各吸収の相対強度比の差によるものと考えられた。同様の現象は、Norton ら¹⁰⁾によっても報告されており、結晶形との関連も示唆されている。又、メタノール中の不純物の影響も無視できず、使用するメタノールによっては 1700 cm^{-1} 付近の吸収が現れるものも見られたことから、メタノールの精製によっても一致度の向上が期待できる。

Table 1 HQI values and rankings of IR spectra of BHMS obtained by HPLC fractionation and PP concentration

Amounts of BHMS fractionated from HPLC	HQI values(Rankings)						
	Amounts of BHMS for spectra registered in the data-base						
	2 μ g	1 μ g	500 ng	100 ng	50 ng	25 ng	10 ng
2 μ g	0.56 (7)	0.51 (5)	0.51 (5)	0.44 (3)	0.47 (4)	0.40 (2)	0.28 (1)
1 μ g	0.62 (7)	0.57 (6)	0.56 (5)	0.51 (3)	0.53 (4)	0.44 (2)	0.3 (1)
500 ng	0.68 (7)	0.65 (5)	0.65 (5)	0.60 (3)	0.63 (4)	0.52 (2)	0.48 (1)
160 ng	0.81 (7)	0.79 (5)	0.80 (6)	0.73 (3)	0.78 (4)	0.62 (2)	0.58 (1)

3・3 化粧品中の BHMS の同定

BHMS を共に 0.05% 含む市販化粧水 2 種を試料として HPLC 分取し, 標準操作法により顕微反射測定した。これらの化粧水はあらかじめメタノールで希釈し, 各々 20% (BHMS 1 μ g), 40% (BHMS 2 μ g) 溶液を調製し試料とした。検索結果を Table 2 に示すが, どちらの化粧水においても 1 と 2 μ g との間で HQI 値及び順位の急激な変化が見られ, PP 濃縮/顕微反射標準スペクトルとの一致には, 単純溶液の約 2~4 倍に相当する量 2 μ g が必要であった。得られたスペクトルを Fig. 5 に示した。KBr 錠剤法のスペクトルと各吸収の相対強度比は異なるものの, BHMS の特性吸収をはっきりと認めることができたことから, 未知化合物の官能基情報も十分に得られるものと考えられた。Fig. 6 には, 325 nm 検出の UV クロマトグラムを示した。本条件は, BHMS の迅速定量条件として日常的に問題なく用いられているものである。しかし, 1 μ g において Table 1 中の HQI 値よりも大きな値が得られたのは, BHMS の保持時間が 4.6 分と比較的早いために, 325 nm では検出されない他の微量成分の影響を受けたものと推察された。

以上, 酸性移動相溶媒を用いるイオン抑制逆相 HPLC からの溶出液の PP 濃縮/顕微反射法による同定法について検討した。揮発性酸として TFA を用いたが, その一部がカラム中の金属と塩を形成し, バックグラウンドとなることが確認されたが, その吸光度を最小に抑える条件を見いだすことができた。又, 市販のスペクトルデータベースによる PP 濃縮/顕微反射標準スペ

Table 2 HQI values and rankings of IR spectra of BHMS obtained by HPLC fractionation and PP concentration of commercial cosmetic lotions

Amounts of BHMS/ μ g	Lotion A		Lotion B	
	HQI	Ranking	HQI	Ranking
2	0.28	1	0.30	1
1	0.46	13	0.55	below 20

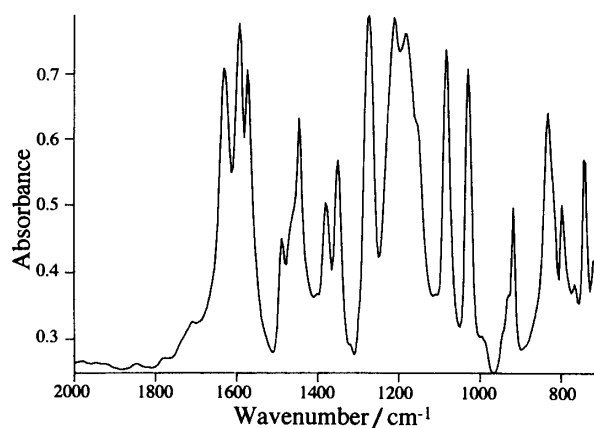
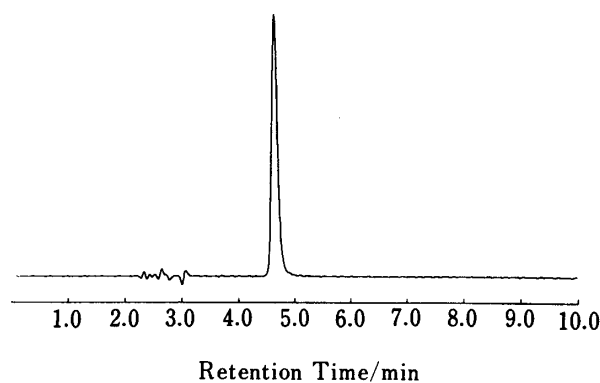
Fig. 5 PP concentrated-microscopic reflection IR spectrum of BHMS (2 μ g) fractionated by HPLC from a commercial cosmetic lotion A

Fig. 6 Chromatogram of a commercial cosmetic lotion A

Sample solution: 40% commercial lotion A in methanol; HPLC condition: column, Capcell Pak C₁₈ UG (4.6 mm i.d.×25 cm); mobile phase, 0.1% TFA in water : methanol=4 : 6; flow rate, 1.0 ml/min; column temp., 40°C; injection volume, 10 μ l

クトルとの一致度及びヒット順位を指標とした場合の本法の同定限界は、 μg レベルであった。

(1996 年 9 月, 日本分析化学会)
(第 45 年会において一部発表)

文 献

- 1) T. Housaki, K. Satoh, K. Nishikida, M. Morimoto: *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **9**, 525 (1988).
- 2) 山本信也, 小松一男, 高松 翼, 松岡昌弘: 高分子論文集, **52**, 524 (1995).
- 3) K. Jinno, C. Fujimoto: *J. Chromatogr.*, **506**, 443 (1990).
- 4) P. R. Griffiths, K. L. Norton, A. J. Lange: *Microchem. J.*, **46**, 261 (1992).
- 5) V. E. Turula, J. A. de Haseth: *Anal. Chem.*, **68**, 629 (1996).
- 6) M. Ikeda, H. Uchihara: *Appl. Spectrosc.*, **46**, 1431 (1992).
- 7) 池田昌彦, 粉川雅至, 佐竹 司, 中田 靖, 西村克美, 原 清明: 第 23 回応用スペクトロメトリー東京討論会講演要旨集, p. 7 (1988).
- 8) 杉谷初雄, 深沢正人: 第 23 回応用スペクトロメトリー東京討論会講演要旨集, p. 13 (1988).
- 9) 福原忠雄, 小松一男, 山本信也, 高松 翼: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 421 (1996).
- 10) K. L. Norton, A. M. Haefner, H. Makishima, G. Jalsovzky, P. R. Griffiths: *Appl. Spectrosc.*, **50**, 1125 (1996).

要 旨

トリフルオロ酢酸を含む水/メタノール系の移動相を用いるイオン抑制 HPLC からの溶出液をピンポイント濃縮し、顕微反射 FT-IR により同定する方法について検討した。標準試料には化粧品中に紫外線吸収剤として微量処方されている 5-ベンゾイル-4-ヒドロキシ-2-メトキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いた。トリフルオロ酢酸に由来するバックグラウンドスペクトルの吸光度は分取容器にポリプロピレン製のものを用い、遠心真空濃縮することで最小限に抑えることができた。又、得られた IR スペクトルからの同定限界の評価については、市販の検索システムを利用して、ピンポイント濃縮により得た標準スペクトル並びにデータベーススペクトルとの一致度を指標として行った。バックグラウンドに出現する水酸基、アルキル基吸収を除く $2000\sim 700\text{ cm}^{-1}$ の範囲で、ピンポイント濃縮標準 IR スペクトルとの一致度により求めた同定限界は、標準試料の HPLC 溶出物では 500 ng 、市販化粧水をメタノール希釈して HPLC 分取した溶出物では $2\text{ }\mu\text{g}$ であった。